

**ALTERNATİF SOLUNUMUN MOLEKÜLER
DÜZEYDE AKTİFLEŞTİRİLMESİ İLE
NOHUT VE BUĞDAY BİTKİLERİNİN
SOĞUK STRESİNE KARŞI DİRENÇLERİNİN
ARTIRILMASI**

Mucip GENİŞEL

**Doktora Tezi
Biyoloji Anabilim Dalı
Doç. Dr. Rahmi DUMLUPINAR
2012
Her hakkı saklıdır**

**ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**ALTERNATİF SOLUNUMUN MOLEKÜLER DÜZEYDE
AKTİFLEŞTİRİLMESİ İLE NOHUT VE BUĞDAY BİTKİLERİNİN
SOĞUK STRESİNE KARŞI DİRENÇLERİNİN ARTIRILMASI**

Mucip GENİŞEL

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ERZURUM
2012**

Her hakkı saklıdır



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

ALTERNATİF SOLUNUMUN MOLEKÜLER DÜZEYDE
AKTİFLEŞTİRİLMESİ İLE NOHUT VE BUĞDAY BİTKİLERİNİN
SOĞUĞA KARŞI DİRENÇLERİNİN ARTIRILMASI

Doç. Dr. Rahmi DUMLUPINAR danışmanlığında, Mucip GENİŞEL tarafından hazırlanan bu çalışma 27/12/2012 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından, Biyoloji Anabilim Dalı'nda Doktora tezi olarak **oybirliği** ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Ökkeş ATICI

İmza :

Üye : Prof. Dr. Yavuz DEMİR

İmza :

Üye : Doç. Dr. Rahmi DUMLUPINAR

İmza :

Üye : Doç. Dr. Hasan TÜRKEZ

İmza :

Üye : Doç. Dr. M. Sinan TAŞPINAR

İmza :

Üye : Doç. Dr. Serkan ERDAL

İmza :

Üye : Yrd. Doç. Dr. M. Nuri AYDOĞAN

İmza :

Yukarıdaki sonucu onaylıyorum

Prof. Dr. İhsan EFEOĞLU
Enstitü Müdürü

Bu çalışma BAP projeleri kapsamında desteklenmiştir.
Proje No: 2011/359

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

Doktora Tezi

ALTERNATİF SOLUNUMUN MOLEKÜLER DÜZEYDE AKTİFLEŞTİRİLMESİ İLE NOHUT VE BUĞDAY BİTKİLERİNİN SOĞUK STRESİNE KARŞI DİRENÇLERİNİN ARTIRILMASI

Mucip GENİŞEL

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Rahmi DUMLUPINAR

Ortak Danışman: Doç. Dr. Serkan ERDAL

Bu araştırmada sitokrom yolu inhibitörleri olan azid ve antimisin A, alternatif solunum yolu inhibitörü olan salisilhidroksamik asit (SHAM) ve alternatif solunum yolu aktivatörü olan piruvatın tolerans yetenekleri farklı olan buğday (*Triticum aestivum* cv. Müfitbey) ve nohut (*Cicer arietinum* cv. Yaşa-05) bitkilerinin soğuğa dirençleri üzerine etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla kontrol şartlarında 13 gün süre ile yetiştirilen buğday bitkileri ile 9 gün yetiştirilen nohut bitkileri uygulama yapıldıktan 12 saat sonra sırasıyla 5/2°C ve 10/5°C sıcaklık değerlerine ayarlanan iklim dolaplarına aktarılmışlardır. Bitkiler 48 saatlik soğuk uygulamasından sonra hasat edilerek moleküler ve biyokimyasal parametrelerindeki değişimler incelenmiştir. Her iki bitkide de uygulanan maddelerin optimum konsantrasyonları azid için 2mM, antimisin A için 2µM, piruvat için 5mM ve SHAM için 4mM olarak belirlenmiştir. Soğuk uygulaması kontrol şartlarına göre hem buğday hem de nohut bitkisinin süperoksid dismutaz (SOD), katalaz (CAT), askorbat peroksidaz (APX) ve glutatyon reduktaz (GR) aktivitelerini artırırken peroksidaz (POD) aktivitesini önemli oranda düşürmüştür. Azid, antimisin A ve piruvat uygulamaları soğuk grubuna göre tüm antioksidan enzim aktivitelerini artırırken, en fazla artış piruvat uygulanan bitkilerde kaydedilmiştir. Oysaki SHAM uygulanan bitkilerde SOD dışındaki tüm enzimlerin aktivitelerinde önemli düşüşler meydana gelmiştir. Doğal-PAGE sonucu elde edilen izoenzim sonuçları da antioksidan enzim aktivitelerinin ortaya koyduğu sonuçları doğrulamıştır. Süperoksit (O_2^-) anyonu üretimi ve hidrojen peroksit (H_2O_2) içeriği ile lipid peroksidasyon seviyesi soğuk uygulaması ile ciddi derecede artmıştır. Soğuk uygulamasına kıyasla azid, antimisin A ve piruvat bu parametrelerdeki artışları önemli derecede indirirken, SHAM uygulaması daha da artırmıştır. Diğer yandan oksijen tüketiminin ölçülmesiyle elde edilen sonuçlar, soğuk uygulamasının AOX enzim aktivitesini önemli derecede artırdığını göstermiştir. Soğuk uygulamasına kıyasla azid, antimisin A ve piruvat uygulamaları AOX aktivitesini artırırken SHAM uygulaması ciddi derecede düşürmüştür. Bu sonuçları teyit edebilmek için AOX proteini ifadesi de western blot tekniği ile moleküler düzeyde belirlenmiştir. Elde edilen bulgular soğuk uygulaması sonucunda AOX proteini ifadesinde kaydadeğer oranda ciddi artışların olduğunu göstermiştir. Antimisin A ve piruvat uygulanan bitkilerde AOX ifadesini daha da artırmışken, SHAM uygulanan bitkilerde soğuğa kıyasla önemli bir değişim gözlenmemiştir. Bu sonuçlar bir bütün olarak değerlendirildiğinde azid, antimisin A ve piruvat uygulamalarının antioksidatif mekanizmasının aktivasyonunun yanı sıra, alternatif solunum yolunun aktivitesini de artırarak oksidatif stresin indirgenmesinde etkili olduğu, böylece buğday ve nohut bitkilerinde düşük sıcaklık direncini artırdığı söylenebilir. Soğuğa direncin artırılmasında en etkili maddenin ise AOX aktivatörü olan piruvat olduğu açıkça ortaya konulmuştur.

2012, 122 sayfa

Anahtar Kelimeler: Alternatif oksidaz, azid, antimisin A, piruvat, salisilhidroksamik asit, solunum, soğuk stresi

ABSTRACT

Ph. D. Thesis

IMPROVEMENT OF RESISTANCE TO COLD STRESS IN WHEAT AND CHICKPEA WITH ACTIVATION OF ALTERNATIVE RESPIRATION AT THE MOLECULAR LEVEL

Mucip GENİŞEL

Atatürk University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biyoloji

Supervisor: Doç. Dr. Rahmi DUMLUPINAR

Co-Supervisor: Doç. Dr. Serkan ERDAL

In this study, it was investigated the effects of inhibitors of respiration pathway, azide and antimycin A, salicylhydroxamic acid (SHAM) which is inhibitor of alternative respiration pathway and pyruvate as activator of alternative respiration pathway on cold resistance of wheat and chickpea which have different tolerance ability. For this purpose, plants grown at control conditions for 9(chickpea)-13(wheat)days were transferred to plant growth chamber to set for wheat (*Triticum aestivum* cv. Müfitbey) chickpea (*Cicer arietinum* cv. Yaşa-05) at 5/2°C and at 10/5°C, respectively after application. The plants were harvested after cold application for 48 hours and examined the changes in molecular and biochemical parameters. For both plants, the optimum concentrations of applied substances were determined as 2mM for azide, 2µM for antimycin A, 5mM for pyruvate and 4mM for SHAM. Compared to control plants, while cold application increased the activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbate peroxidase (APX) and glutathione reductase (GR), it considerably decreased activities of peroxidase of wheat and chickpea. While azide, antimycin A and pyruvate applications increased all antioxidant enzyme activities compared to cold group, the maximum increase was recorded at pyruvate-applied plants. Whereas all enzymes activities except SOD exhibited importantly decreases in SHAM applied plants. The results of isoenzyme obtained from natural-PAGE approved the results that activities of antioxidants enzymes revealed. The production of superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$), content of hydrogen peroxide (H_2O_2) and level of lipid peroxidation enhanced significantly after cold application. When compared to cold application alone, azide, antimycin A and pyruvate pretreatments severely reduced increases in these parameters, whereas SHAM pretreatment more improved the data. On the other hand, the results obtained from oxygen consumption demonstrated that cold application enhanced remarkably AOX activity. In comparison to only cold treatment, azide, antimycin A and pyruvate treatments more enhanced the AOX activity, SHAM treatment markedly reduced the activity. To confirm this data, expression amount of AOX protein was determined by western blot technique at the molecular level. The obtained data exhibited that cold application caused to remarkable increases in expression in AOX protein. While AOX expression was more enhanced with antimycin A and pyruvate pretreatments, it was not determined significantly changes compared to cold in SHAM-pretreated plants. In view of these results, azide, it may be said that azide, antimycin A and pyruvate pretreatments were effective in reducing of oxidative stress by increasing activity of alternative respiration pathway as well as activation of antioxidative system, thus improved the resistance to cold of wheat and chickpea. The study clearly elucidated that the most effective substance on resistance to cold was pyruvate activator of AOX.

2012, 122 pages

Keywords: Alternative oxidase, azide, antimycin A, pyruvate, salicylhydroxamic acid, respiration, cold stress

TEŞEKKÜR

Doktora tezi olarak hazırlanan bu araştırma, Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Bitki Fizyolojisi Araştırma Laboratuvarı'nda yapılmıştır. Bu araştırma 2011-359 nolu Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi olarak desteklenmiştir.

Öncelikle çalışmalarımnda her türlü desteği sağlayan kıymetli hocam Sayın Doç. Dr. Rahmi DÜMLUPINAR'a en içten şükranlarımı sunarım.

Çalışmalarım esnasında gece gündüz yanımda olan dostluk kavramının gerçek sahibi ve hocam Sayın Doç. Dr. Serkan ERDAL'a teşekkür ederim.

Çalışmalarımı her an takip edip bana yol gösteren değerli hocam ve bölüm başkanımız Sayın Prof. Dr. Ökkeş ATICI'ya, özellikle western blot çalışmalarına ilk adımımı atmamı sağlayan deneyimleriyle beni aydınlatan kıymetli hocam Sayın Prof. Dr. Yavuz DEMİR'e sonsuz teşekkür ederim.

Deneyslerimi kendi deneyleri gibi gören ve yardımlarını esirgemeyen Hülya TÜRK, Zeynep GÖRÇEK, Murat KIZILKAYA ve Farideh Khataei KHOSROUSHAHİ'ya ayrıca tez düzeltmelerimde yardımını esirgemeyen kıymetli arkadaşım Emir Alper TÜRKÖĞLU'na minnettarım.

Doktora çalışmalarım esnasında ihmal etmeme rağmen maddi ve manevi desteğini esirgemeyen sevgili eşim Betül oğullarım Ömer Erşat ve Yusuf Kaan'a şükranlarımı sunarım. Ayrıca bugünlere gelmemde hem annelik hem de babalık görevini tek başına gerçekleştiren kıymetli anneme sonsuz teşekkür ederim.

Mucip GENİŞEL

Aralık 2012

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER	20
2.1. Reaktif Oksijen Türleri.....	20
2.1.1. Singlet oksijen ($^1\text{O}_2$)	20
2.1.2. Süperoksit radikali ($\text{O}_2^{\cdot-}$)	21
2.1.3. Hidrojen peroksit (H_2O_2)	21
2.1.4. Hidroksil radikali ($\cdot\text{OH}$).....	22
2.2. Lipid Peroksidasyonu	23
2.3. Antioksidan Enzimler.....	24
2.3.1. Süperoksit dismutaz (SOD) (EC 1. 15. 1. 1).....	24
2.3.2. Peroksidaz (POD) (EC 1.11.1.7).....	25
2.3.3. Katalaz (CAT) (EC 1. 11. 1. 6)	26
2.3.4. Askorbat peroksidaz (APX) (EC 1. 11. 1. 11)	27
2.3.5. Glutasyon redüktaz (GR) (EC 1. 6. 4. 2).....	27
2.4. Antioksidan Bileşikler.....	28
2.4.1. Glutasyon.....	28
2.4.2. Askorbat (L-Askorbik Asit, C Vitamini).....	29
3. MATERYAL ve YÖNTEM	31
3.1. Yararlanılan Alet ve Cihazlar.....	31
3.2. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanmaları	32
3.3. Yöntemler.....	36
3.3.1. Bitkilerin büyütülmesi	36
3.3.2. Çözünebilir protein miktarının tayini	36

3.3.3. Antioksidan enzim aktivitelerinin belirlenmesi	38
3.3.3.a. Katalaz (CAT) aktivitesinin belirlenmesi.....	38
3.3.3.b. Peroksidaz aktivitesinin belirlenmesi	39
3.3.3.c. Süperoksid dismutaz aktivitesinin belirlenmesi	40
3.3.3.d. Askorbat peroksidaz (APX) aktivitesinin tayini	40
3.3.3.e. Glutasyon redüktaz (GR) aktivitesinin tayini	41
3.3.4. Antioksidan maddelerin içeriklerinin belirlenmesi.....	41
3.3.4.a. Glutasyon ekstraksiyonu	41
3.3.4.b. Glutasyon (GSH) içeriğinin belirlenmesi	41
3.3.4.c. Askorbik asit (ASC) içeriğinin belirlenmesi	42
3.3.5. Lipid peroksidasyon miktarının belirlenmesi.....	43
3.3.6. Hidrojen peroksit (H ₂ O ₂) miktarının belirlenmesi	44
3.3.7. Süperoksit (O ₂ ⁻) üretiminin belirlenmesi.....	45
3.3.8. SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi (SDS PAGE)	45
3.3.9. Poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE) ile izoenzimlerin belirlenmesi.....	46
3.3.9.a. Süperoksit dismutaz (SOD) izoenzimlerinin belirlenmesi	46
3.3.9.b. Askorbat peroksidaz (APX) izoenzimlerinin belirlenmesi	47
3.3.10. Mitochondri izolasyonu	47
3.3.11. Hücresel total solunum değeri ve AOX (Alternatif oksidaz) aktivitesi	48
3.3.12. AOX ifadesi analizi (western blot).....	48
3.3.13. İstatistiksel analiz	49
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	50
4.1. Antioksidan Enzim Aktiviteleri ve İzoenzim Sonuçları	50
4.1.1. SOD aktivitesi ve izoenzim sonuçları.....	50
4.1.2. POD aktivitesi sonuçları	54
4.1.3. CAT aktivitesi sonuçları	57
4.1.4. APX aktivitesi ve izoenzim sonuçları.....	60
4.1.5. GR aktivitesi sonuçları.....	65
4.2. Antioksidan Madde İçeriği Sonuçları	68
4.2.1. Askorbat içeriği sonuçları	68
4.2.2. Glutasyon içeriği sonuçları.....	71
4.3. Süperoksit (O ₂ ⁻) Üretimi Sonuçları	74

4.4. H ₂ O ₂ İçeriği Sonuçları.....	77
4.5. Lipid Peroksidasyon Seviyesi (MDA içeriği) Sonuçları.....	80
4.6. AOX Aktivitesi ve AOX Proteinin İfade Düzeyi Sonuçları (Western Blot)	83
5. SONUÇ ve TARTIŞMA.....	89
5.1. Azid, Antimisin A, Piruvat ve SHAM Uygulamalarının Antioksidan Sistem Üzerine Etkileri	90
5.2. Azid, Antimisin A, Piruvat ve SHAM Uygulamalarının ROT Oluşumu Üzerine Etkileri.....	95
5.3. Azid, Antimisin A, Piruvat ve SHAM Uygulamalarının MDA İçeriği Üzerine Etkileri.....	98
5.4. Azid, Antimisin A, Piruvat ve SHAM Uygulamalarının Hücre Solunum ve Alternatif Solunuma Etkileri.....	100
5.5. Azid, Antimisin A, Piruvat ve SHAM Uygulamalarının AOX Proteinin İfadesi ve Aktivitesi Üzerine Etkileri	103
KAYNAKLAR	107
ÖZGEÇMİŞ	123

SİMGELER DİZİNİ

AOX	: Alternatif oksidaz
APX	: Askorbat peroksidaz
CAT	: Katalaz
U	: Enzim ünitesi
EDTA	: Etilendiamin tetra asetik asit
GR	: Glutasyon redüktaz
GSH	: İndirgenmiş glutasyon
GSSG	: Yükseltgenmiş glutasyon
mM	: Milimolar
μ l	: Mikrolitre
μ M	: Mikromolar
NBT	: Nitroblue tetrazolium klorür
PAGE	: Poliakrilamid jel elektroforezi
POD	: Peroksidaz
PVP	: Polivinilpirrolidon
ROT	: Reaktif oksijen türleri
rpm	: Devir/dakika
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
SOD	: Süperoksit dismutaz
TBA	: Tiobarbutirik asit
TCA	: Trikloroasetik asit
$x g$: Yerçekimi ivmesinin katı
nmol	: Nano mol
mg	: Miligram

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Mitokondri elektron taşıma zinciri	5
Şekil 1.2. Alternatif oksidazın inaktif ve aktif formları.....	9
Şekil 1.3. Mitokondride AOX in regülasyonu ve yapısı.....	10
Şekil 1.4. Elektron taşıma zinciri komplekleri ve inhibitörleri.....	11
Şekil 1.5. Bitki mitokondrisindeki terminal oksidazlar için potansiyel düzenlenme yolları	14
Şekil 2.1. Askorbat-glutasyon çemberinde görevli enzimler	30
Şekil 3.1. Protein tayini için kullanılan standart grafik	37
Şekil 3.2. Katalaz aktivitesi ölçümünde kullanılan standart grafik	39
Şekil 3.3. Glutasyon içeriğini belirlemede kullanılan standart grafik	42
Şekil 3.4. Askorbik asit içeriğini belirlemede kullanılan standart grafik	43
Şekil 3.5. Hidrojen peroksit (H ₂ O ₂) miktarını belirlemede kullanılan standart grafik ...	44
Şekil 4.1. Azid, antimisin A, piruvat ve SHAM uygulamalarının nohut bitkisinde SOD aktivitesi üzerine etkileri	51
Şekil 4.2. Nohut bitkisine azid, antimisin A, piruvat ve SHAM uygulamalarının SOD izoenzimleri üzerine etkisi.....	52
Şekil 4.3. Azid, antimisin A, piruvat ve SHAM uygulamalarının buğday bitkisinde SOD aktivitesi üzerine etkileri	53
Şekil 4.4. Buğday bitkisine azid, antimisin A, piruvat ve SHAM uygulamalarının SOD izoenzimleri üzerine etkisi.....	54
Şekil 4.5. Azid, antimisin A, piruvat ve SHAM uygulamalarının nohut bitkisinde POD aktivitesi üzerine etkileri	55
Şekil 4.6. Azid, antimisin A, piruvat ve SHAM uygulamalarının buğday bitkisinde POD aktivitesi üzerine etkileri	57
Şekil 4.7. Azid, antimisin A, piruvat ve SHAM uygulamalarının nohut bitkisinde CAT aktivitesi üzerine etkileri	58
Şekil 4.8. Azid, antimisin A, piruvat ve SHAM uygulamalarının buğday bitkisinde CAT aktivitesi üzerine etkileri	60

Şekil 4.9. Azid, antimisin A, piruvat ve SHAM uygulamalarının nohut bitkisinde APX aktivitesi üzerine etkileri	61
Şekil 4.10. Nohut bitkisine azid, antimisin A, piruvat ve SHAM uygulamalarının APX izoenzimleri üzerine etkileri.....	62
Şekil 4.11. Azid, antimisin A, piruvat ve SHAM uygulamalarının buğday bitkisinde APX aktivitesi üzerine etkileri	64
Şekil 4.12. Buğday bitkisine azid, antimisin A, piruvat ve SHAM uygulamalarının APX izoenzimleri üzerine etkileri.....	64
Şekil 4.13. Azid, antimisin A, piruvat ve SHAM uygulamalarının nohut bitkisinde GR aktivitesi üzerine etkileri.....	66
Şekil 4.14. Azid, antimisin A, piruvat ve SHAM uygulamalarının buğday bitkisinde GR aktivitesi üzerine etkileri.....	68
Şekil 4.15. Azid, antimisin A, piruvat ve SHAM uygulamalarının nohut bitkisinde askorbat içeriği üzerine etkileri	69
Şekil 4.16. Azid, antimisin A, piruvat ve SHAM uygulamalarının buğday bitkisinde askorbat içeriği üzerine etkileri	71
Şekil 4.17. Azid, antimisin A, piruvat ve SHAM uygulamalarının nohut bitkisinde glutatyon içeriği üzerine etkileri	72
Şekil 4.18. Azid, antimisin A, piruvat ve SHAM uygulamalarının buğday bitkisinde glutatyon içeriği üzerine etkileri	74
Şekil 4.19. Azid, antimisin A, piruvat ve SHAM uygulamalarının nohut bitkisinde O_2^- üretimi üzerine etkileri	75
Şekil 4.20. Azid, antimisin A, piruvat ve SHAM uygulamalarının buğday bitkisinde O_2^- üretimi üzerine etkileri	77
Şekil 4.21. Azid, antimisin A, piruvat ve SHAM uygulamalarının nohut bitkisinde H_2O_2 içeriği üzerine etkileri	78
Şekil 4.22. Azid, antimisin A, piruvat ve SHAM uygulamalarının buğday bitkisinde H_2O_2 içeriği üzerine etkileri	80
Şekil 4.23. Azid, antimisin A, piruvat ve SHAM uygulamalarının nohut bitkisinde MDA içeriği üzerine etkileri	81
Şekil 4.24. Azid, antimisin A, piruvat ve SHAM uygulamalarının buğday bitkisinde MDA içeriği üzerine etkileri	83

Şekil 4.25. Nohut bitkisinde azid, antimisin A, piruvat ve SHAM uygulamalarıyla hücre solunum değeri ve AOX aktivitesinin değışımi (%).....	85
Şekil 4.26. Azid, antimisin A, piruvat ve SHAM uygulamalarıyla nohut bitkisinde AOX proteini translasyon düzeyi değışımi	85
Şekil 4.27. Buğday bitkisinde azid, antimisin A, piruvat ve SHAM uygulamalarıyla hücre solunum değeri ve AOX aktivitesinin değışımi (%).....	87
Şekil 4.28. Azid, antimisin A, piruvat ve SHAM uygulamalarıyla buğday bitkisinde AOX proteini translasyon düzeyi değışımi	87

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1. Nohut bitkisinde uygulamalara göre SOD aktivitesinin değişimi	51
Çizelge 4.2. Buğday bitkisinde uygulamalara göre SOD aktivitesinin değişimi.....	53
Çizelge 4.3. Nohut bitkisinde uygulamalara göre POD aktivitesinin değişimi	55
Çizelge 4.4. Buğday bitkisinde uygulamalara göre POD aktivitesinin değişimi.....	56
Çizelge 4.5. Nohut bitkisinde uygulamalara göre CAT aktivitesinin değişimi	58
Çizelge 4.6. Buğday bitkisinde uygulamalara göre CAT aktivitesinin değişimi.....	59
Çizelge 4.7. Nohut bitkisinde uygulamalara göre APX aktivitesinin değişimi	61
Çizelge 4.8. Buğday bitkisinde uygulamalara göre APX aktivitesinin değişimi.....	63
Çizelge 4.9. Nohut bitkisinde uygulamalara göre GR aktivitesinin değişimi.....	66
Çizelge 4.10. Buğday bitkisinde uygulamalara göre GR aktivitesinin değişimi	67
Çizelge 4.11. Nohut bitkisinde uygulamalara göre askorbat içeriğindeki değişimler	69
Çizelge 4.12. Buğday bitkisinde uygulamalara göre askorbat içeriğindeki değişimler..	70
Çizelge 4.13. Nohut bitkisinde uygulamalara göre glutatyon içeriğindeki değişimler...	72
Çizelge 4.14. Buğday bitkisinde uygulamalara göre glutatyon içeriğindeki değişimler	73
Çizelge 4.15. Nohut bitkisinde uygulamalara göre süperoksit (O_2^-) üretimi değişimi.....	75
Çizelge 4.16. Buğday bitkisinde uygulamalara göre süperoksit (O_2^-) üretimi değişimi.....	76
Çizelge 4.17. Nohut bitkisinde uygulamalara göre H_2O_2 içeriğinin değişimi	78
Çizelge 4.18. Buğday bitkisinde uygulamalara göre H_2O_2 içeriğinin değişimi.....	79
Çizelge 4.19. Nohut bitkisinde uygulamalara göre MDA içeriğinin değişimi	81
Çizelge 4.20. Buğday bitkisinde uygulamalara göre MDA içeriğinin değişimi.....	82
Çizelge 4.21. Nohut bitkisinde uygulamalara göre hücresel solunum değeri ve AOX aktivitesi	84
Çizelge 4.22. Buğday bitkisinde uygulamalara göre hücresel solunum değeri ve AOX aktivitesi.....	86

1. GİRİŞ

Bitkiler büyüme ve gelişmelerini sürdürebilmek ve hayat döngülerini tamamlayabilmek için sıcaklık, su, ışık ve mineral madde gibi özellikler yönünden optimum değerlere yakın ortamlara ihtiyaç duyarlar. Bu değerlerin çok altı veya üstüne sahip ortamlar bitkiler için uygun olmayan çevreler olup, onların strese girmesi, verimliliklerinin azalması gibibüyüme ve gelişmeleri üzerine önemli negatif etkilere sahiptirler (Wang *et al.* 2003a). Bitkilerde büyüme ve gelişmeyi, ürün kalitesini, verimliliği, dayanıklılığı ve türlerin dağılımını kısıtlayan en önemli abiotik streslerden biri de ekstrem sıcaklıklardır. Poikiloterm canlılar olan bitkiler, normal büyüme ve gelişim gösterebilmek için belirli optimum sıcaklık derecelerine ihtiyaç duymakta, bu derecenin altındaki ve üstündeki sıcaklıklar bitkilerde ekstrem sıcaklık stresine neden olmaktadır (Mahajan and Tuteja 2005).

Dünyadaki ekilebilir alanların yaklaşık üçte biri, her yıl belli aralıklarla bitkilerin yetişmesi için uygun olmayan düşük sıcaklıklara maruz kalmaktadır (Larcher 2001; Beck *et al.* 2004). Bu nedenle, ekstrem sıcaklık stresi üzerine yapılan çalışmalar özellikle düşük sıcaklık stresi üzerine yoğunlaşmıştır (Bruggemann *et al.* 1995; Willits and Peet 1998).

İyi bilinmektedir ki, bitkiler düşük sıcaklıklara maruz kalınca önemli derecede zarar görmektedirler (Matsuo *et al.* 1992; Larcher 2001; Erdal 2012). Bu nedenle düşük sıcaklığın özellikle ekonomik değeri olan bitkiler üzerine neden olduğu zararları önlemek için her yıl çok sayıda çalışma yapılmasına ve bu amaç için çok büyük bütçeler harcanmasına karşın, henüz istenilen düzeyde sonuçlar elde edilememiştir (Steponkus 1992). Birçok araştırmacı, bitkilerin düşük sıcaklığa karşı toleranslarının 1°C bile artırılması ile ekonomik kayıpların ve ürün kayıplarının önemli derecede önüne geçilebileceğini rapor etmiştir (Mutlu 2009; Erdal 2012).

Soğuk stresinden etkilenme derecelerine göre bitkiler 3 gruba ayrılırlar; soğuga hassas olanlar, soğuga dayanıklı fakat dona duyarlı olanlar ve dona dayanıklı olanlar. İlk grupta yer alan soğuga hassas olan bitkiler, 12°C'nin altındaki sıcaklıklardan önemli oranda zarar görürler. İkinci grupta yer alan soğuga dayanıklı fakat dona duyarlı olan bitkiler ise, 12°C'nin altındaki sıcaklıklara uyum sağlayabilir, fakat donma sıcaklıklarında hayatta kalamazlar. Son grupta yer alan dona dayanıklı olan bitkiler ise, donma sıcaklığının altındaki sıcaklıklarda hayatta kalabilirler ve bu sıcaklıklara uyum sağlayabilirler.

Düşük sıcaklık stresi ile donma stresinin mekanizmaları ve etki şekilleri birbirinden farklıdır. Düşük sıcaklık hücreler üzerine doğrudan etki ederek hasar meydana getirir. Oysaki donma olayı, hücreleri buz oluşumu ile dolaylı olarak hasara uğratan bir olaydır (Pearce 1999).

Düşük sıcaklık, bitkilerde çimlenme aşamasından çiçeklenme aşamasına kadar tüm büyüme ve gelişme evrelerinde önemli inhibisyonlara neden olmaktadır (Lyons 1973; Wang *et al.* 2003b). Soğuk stresi, bitkilerde anormal olgunlaşma, su kaybının artması, yüzeyde korozyon, aşırı miktarda etilen üretimi, bitki hastalıklarına aşırı hassasiyetin gelişimi ve hücre zarlarının seçici geçirgen özelliğinin tahrip olması gibi pek çok semptomu yol açar (Risse *et al.* 1987). Bütün bu olumsuz durumlara ek olarak soğuk stresi, bitki yapısında bulunan proteinlerin denatürasyonuna da neden olur (Shao *et al.* 2008).

Bitkilerde soğuk hasarının ilk belirtilerinden biri, kök bölgesinden su alınıması ve transpirasyon arasındaki dengenin bozulması ile meydana gelen gövde dehidrasyonudur (Vernieri *et al.* 2001). Buna bağlı olarak, kökte olduğu gibi gövdede de büyüme hızında ve yaprak genişliğinde önemli inhibisyonlar meydana gelir. Daha şiddetli soğuk stresi, hücresel otolizi ve yaşlanmayı artırır. Böylece tüm dokuda ya da dokuların yüzeyinde lezyonlar meydana gelir. Bu lezyonlar, genellikle hücre hasarına bağlı olarak yaprak epidermisinde çukur ya da batık alanlar olarak ortaya çıkar. Ayrıca soğuk stresi esnasında ışık tarafından neden olunan fotooksidasyondan kaynaklanan klorofilin

yapısındaki bozulmalar, yapraklarda klorozis ve nekrozise sebep olur (Saltveit and Morris 1990). Diğer taraftan soğuk stresi, bitkilerin reproduktif aşamalarında polen tüpü gelişimini bozarak çiçek fertilizasyonunda başarısızlığa ve depo maddesi bakımından fakir olan tohum üretimine yol açar. Bu yüzden tohum verimliliğinde büyük ölçekte azalmalar meydana gelir (Srinivasan *et al.* 1998; Clarke and Siddique 2004; Nayyar *et al.* 2005).

Soğuk stresi bahsedilen tüm bu olumsuz etkileri, bitki metabolizmasını bozup fizyolojik düzensizliklere neden olarak meydana getirir (Saltveit and Morris 1990). Soğuk stresinin ilk hasar meydana getirdiği yer kloroplasttır. Dolayısıyla fotosentez olayı üzerine önemli inhibisyon etkisine sahiptir. Soğuk stresi, PSII anten komplekslerinde ve PSII reaksiyon merkezinde büyük hasarlar ve kalvin siklusunu oluşturan enzimlerinin aktivitelerinde önemli inhibisyonlara neden olur (Ortiz-Lopez *et al.* 1990; Fryer *et al.* 1995; Haldimann *et al.* 1996; Kingston-Smith *et al.* 1997). Böylece bitki büyümesi ve gelişimi için elzem olan fotosentez, büyük ölçüde sınırlandırılmış olur (Caulfield and Bunce 1988; Van Heerden and Krüger 2000; Rymen *et al.* 2007).

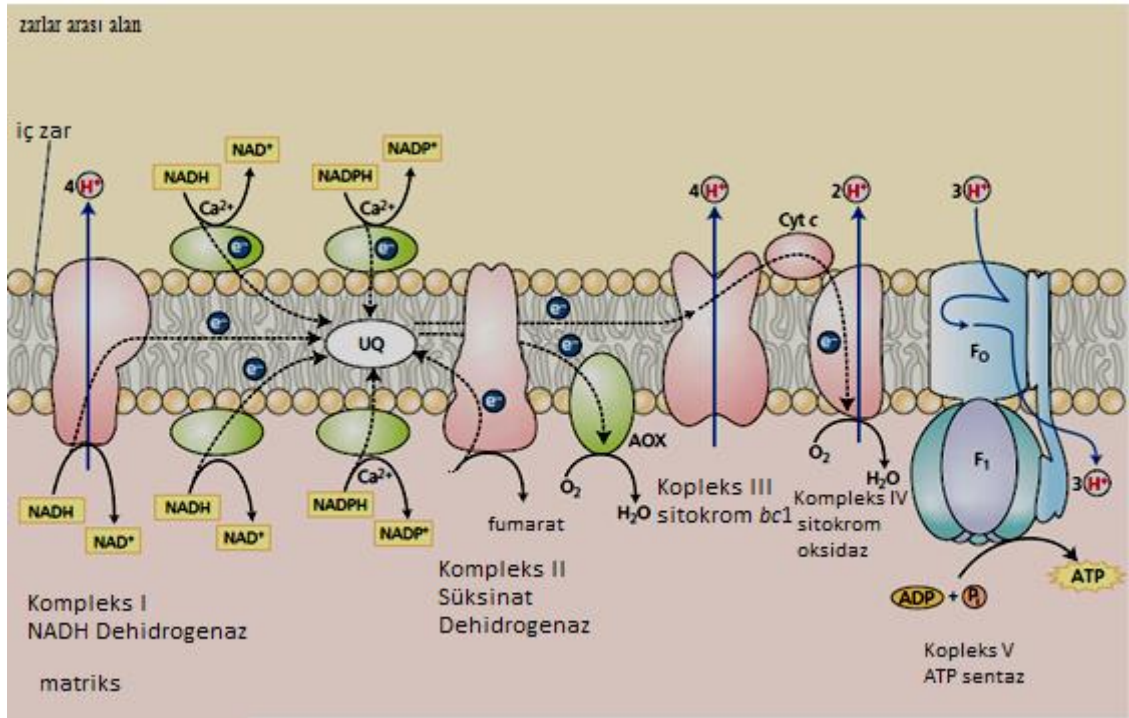
Öte yandan, ışıktaki düşük sıcaklığa maruz kalma sonucunda PSI'nin verici bölgesinde oksijenin indirgenmesi ile süperoksit radikali veya uyarılmış klorofil molekülünün enerjisini oksijene transfer ederek singlet oksijen üretiminin artmasının, hücredeki bileşenlerde oksidatif reaksiyonlara ve fotosentetik aparatlarda fotoinhibisyona neden olduğu birçok araştırmacı tarafından bildirilmiştir (Wise 1995; Foyer *et al.* 2002; Hogewoning and Harbinson 2007).

Strese maruz kalan bitkilerde, mitokondri elektron taşıma zincirinin aşırı indirgenmesi ve kloroplastlarda CO₂ fiksasyonunun sınırlandırılması sonucunda süperoksit radikali, hidroksil anyonu ve hidrojen peroksit gibi reaktif oksijen türlerinde (ROT) anormal değerlerde artışlar gözlenir (Davidson and Schiestl 2001; Suzuki and Mitter 2006). Oluşan bu ROT'lar oksidatif strese yol açarak üşüme hasarının derecesini artırır (Prasad *et al.* 1994; Shen *et al.* 1999).

Soğuk stresinin etkilediği bir diğer hayati mekanizma ise mitokondrilerde gerçekleşen solunum olayıdır. Soğuk stresinin solunum üzerine etkilerini belirlemeye yönelik yapılan çalışmalarda, sıcaklığın düşmesiyle birlikte solunumun dikkate değer bir oranda hızlandığı saptanmıştır. Patates yumrularının 10°C'den 1°C'ye aktarılmasının ikinci gününde, solunum değerinde üç kat artış tesbit edilmiştir (Zhou and Solomos 1998). Yine benzer bir çalışmada ise, 20°C'den 5°C'ye aktarılan lale soğanlarındaki O₂ tüketiminin dolayısı ile oksidatif fosforilasyon hızının belirgin derecede arttığı gözlemlenmiştir (Kannerworffand Vander Plas 1994).

Solunum üzerine yapılan diğer çalışmalarda da benzer sonuçlar elde edilmekle birlikte, bitkilere özgü olan alternatif solunum hızının da çok ciddi değerlerde arttığı belirlenmiştir. Örneğin, 25°C'de yetiştirilen patates yumrularının anazaran, 5°C'de yetiştirilen patates yumrularındaki CO₂ çıkışının soğuk uygulamasının ilk dört gününde hızla arttığı, onuncu günde ise en yüksek seviyeye ulaştığı tespit edilmiştir. Aynı koşullar altındaki patates yumrularından izole edilen mitokondrilerde alternatif oksidaz (AOX) aktivitesinin ise kontrole oranla 10 kat daha fazla olduğu tespit edilmiştir (Borecky and Vercesi 2005). Soğuk stresine maruz kalan bitkilerde AOX aktivitesinin bu kadar yüksek değerde artması, soğuk stresine cevapta antioksidan sisteme ek olarak AOX'un da önemli bir etken olabileceği fikrini ortaya çıkarmaktadır. Soğuk stresinin etkisiyle bu kadar büyük oranlarda değişime uğrayan solunum olayının normal sitokrom yolu ile alternatif solunum yolu, mitokondri iç zarlarında yerleşmiş olan protein kompleksleri tarafından düzenlenmektedir.

İç mitokondri zarlarına yerleşmiş olan ve elektron taşıma zinciri olarak adlandırılan bu sistem, beş tane protein kompleksi içerir. Bu protein komplekslerinden dört tanesi, oksidoredüktaz (kompleks I-IV) ve bir tanesi ise ATP sentaz kompleksidir (kompleks V) (Dudkina *et al.* 2006) (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. Mitokondri elektron taşıma zinciri (Taiz and Zeiger 2008)

Kompleks I, $\text{NADH} + \text{H}^+$ 'ı kısaca NADH 'ı NAD^+ 'a yükseltgeme ve ubikinonu ubikinola indirgeme fonksiyonu olan NADH -ubikinon oksidoredüktaz kompleksidir. Solunum zincirine elektronların en büyük giriş kapısı olan bu kompleks, yaklaşık 1000 kDa molekül ağırlığına sahip olup, 40 farklı alt birimden meydana gelmektedir. Kompleks I'in bir bölgesi mitokondri iç zarının içine yerleşmiş olup proton taşıma görevi görmektedir, diğer bölgesi ise mitokondri matriksinin içine doğru çıkıntı yapmış olup NADH 'ın oksidasyonunda görev yapmaktadır (Abdrakhmanova *et al.* 2004; Friedrich and Böttcher 2004). NADH 'tan ubikinona elektron transferi olurken, transfer edilen her elektron çifti için kompleks I'den zarlar arası boşluğa 4 proton pompalanır (Friedrich and Böttcher 2004). Elektron taşıma zincirinin ilk basamağı olan bu kompleks rotenon, piericidin A ve kapsaisin gibi bileşiklere hassas olup, bu bileşikler tarafından inaktive edilir (Esposti 1998).

Diğer yandan, mitokondri iç zarında bitki mitokondrilerine özgü olan iki tip NADH dehidrogenaz daha bulunur. Bunlardan ilki içsel NADH -dehidrogenaz olup, mitokondri iç zarının iç yüzeyinde yani matriks tarafında bulunur. Diğeri ise dışsal NADH -

dehidrogenaz olup, mitokondri iç zarının dış yüzeyinde yani zarlar arası kısımda bulunur. Her ikienzim de özellikle stres durumlarında ve kompleks I'in aşırı uyarılma durumlarında işlev görürler. Ancak kompleks I'in aksine bu iki tip NADH-dehidrogenaz rotenona hassas olmayıp, aynı zamanda ubikinona transfer ettikleri elektronlar için de zarlar arasına proton pompalamazlar (Moller 2002). Böylece bu kompleksler üzerinden transfer edilen elektronlar vasıtasıyla, proton gradiyenti meydana gelmez.

Mitokondrial oksidatif fosforilasyon sisteminin en küçük protein kompleksi, hidrofobik membran proteinlerine bağlı iki alt ünite içeren kompleks II'dir. Kompleks II yani diğer adıyla süksinat-ubikinon oksidoredüktaz kompleksi, solunum zincirine elektronların ikinci giriş noktasıdır. FADH₂ aracılığıyla taşınan elektronlar, kompleks II üzerinden sisteme giriş yaparlar. Bu kompleks aynı zamanda, hem ETS hem de krebs döngüsünün ortak bir elemanıdır. Kompleks II'den ubikinola transfer edilen elektronlar için proton pompalanması gerçekleşmez. Dolayısıyla, bu kompleksin proton gradiyenti oluşumu ve dolayısıyla ATP sentezinde bir katkısı yoktur (Yankovskaya *et al.* 2003).

Kompleks III (ubikinol-sitokrom c oksidoredüktaz), mitokondrial oksidatif fosforilasyon sisteminin merkezine yerleşmiş, dimerik yapılardır (Berry *et al.* 2000). Bu dimerik yapılardan her biri 10 veya 11 farklı alt ünitelerden oluşur. Bir bölümü mitokondri iç zarına gömülü olan bu kompleks, yaklaşık 500 kDa'luk bir molekül ağırlığına sahiptir (Dudkina *et al.* 2006). Sitokrom *b* ve *c1*'den oluşan kompleks III'ün spesifik inhibitörü Antimisin A'dır. Bu madde sitokrom *b* ile *c1* arasındaki elektron akışını keserek, kompleks III'ün inhibisyonuna neden olur (Storey 1972; Roberts *et al.* 1980).

Kompleks IV (sitokrom c-O₂ oksidoredüktaz) solunum zincirinin sonuna yerleşmiştir. Membran içerisinde monomer veya dimer olarak bulunur (Michel *et al.* 1998). 13 alt ünitelerden oluşan bu kompleks, 220 kDa molekül ağırlığına sahiptir. Kompleks III ile kompleks IV arasında elektron akışını, mitokondri iç zarının yüzeyine bağlı ve hareket yeteneğine sahip küçük bir protein olan sitokrom *c* sağlar (Taiz and Zeiger 2008). Kompleks IV, sitokrom *c* yoluyla kompleks III'ten elektronları alarak zarlar arasına proton pompalar ve moleküler oksijeni indirgeyerek su molekülü oluşmasında görev alır

(Lambers 1997; Parsons 1998). Bu kompleksin redox reaksiyon merkezinde (sitokrom a , sitokrom a_3 , Cu_A ve Cu_B) bulunan enzimlerden sitokrom a_3 'e cıyanürün bağlanması, *in vivo* ortamda kompleksi inhibe ederek elektron akışını keser (Jones *et al.* 1984). Siyanüre benzer olarak karbon monoksit (CO) ve azid de (NaN_3) sitokrom c oksidazı inhibe eder (Wilson 1967).

Elektron taşıma zincirinde zarlar arasına kompleks I, III ve IV'ten proton pompalanıp mitokondri iç zarları arasında bir elektrokimyasal gradient farkı oluşturulur. Bu gradient farkı, kompleks V olarak adlandırılan ATP sentaz vasıtasıyla ADP'ye fosfat bağlanması için gerekli olan potansiyel enerjiyi sağlar (Boyer 1997).

ATP sentaz, membranına tutunmayı sağlayan F_o -bölgesi ile F_1 -bölgesi adı verilen baş kısmından oluşur (Stock *et al.* 2000). Yaklaşık 15 farklı alt ünitelerden oluşan bu enzim kompleksi 500-600 kDa molekül ağırlığına sahiptir. ATP sentazın iki bölgesi, kataliz boyunca dönebilen merkez sap ve baş bölgesinin dönmesini önleyen periferik bir sap ile birbirine bağlıdır. F_o ile F_1 alt ünitelerinin dönmesi mitokondri iç zarlarının iki tarafı arasında bir protein gradienti oluşmasına sebep olur ki; bu gradiyent farkı ADP fosforilasyonunun temelidir (Dudkina *et al.* 2006).

Bitki mitokondri solunum zincirinde sitokrom yolu olarak adlandırılan kompleks I-IV yolu dışında, alternatif solunum yolu olarak adlandırılan ve hayvanlarda bulunmayan bir yol daha bulunur (Vanlerberghe and McIntosh 1997). Bu yolda elektronlar, ubikinon üzerinden kompleks III yerine alternatif oksidaz (AOX) enzimine aktarılırlar (Izabela *et al.* 2003). Elektronları alan AOX, oksijenin suya indirgenmesini sağlar, ancak zarlar arasına H^+ pompalamaz. Bu nedenle alternatif solunum yolunda ubikinon-oksijen arası elektron akışından kaynaklanan serbest enerji ısı olarak ortama yayılır (Vanlerberghe and McIntosh 1997).

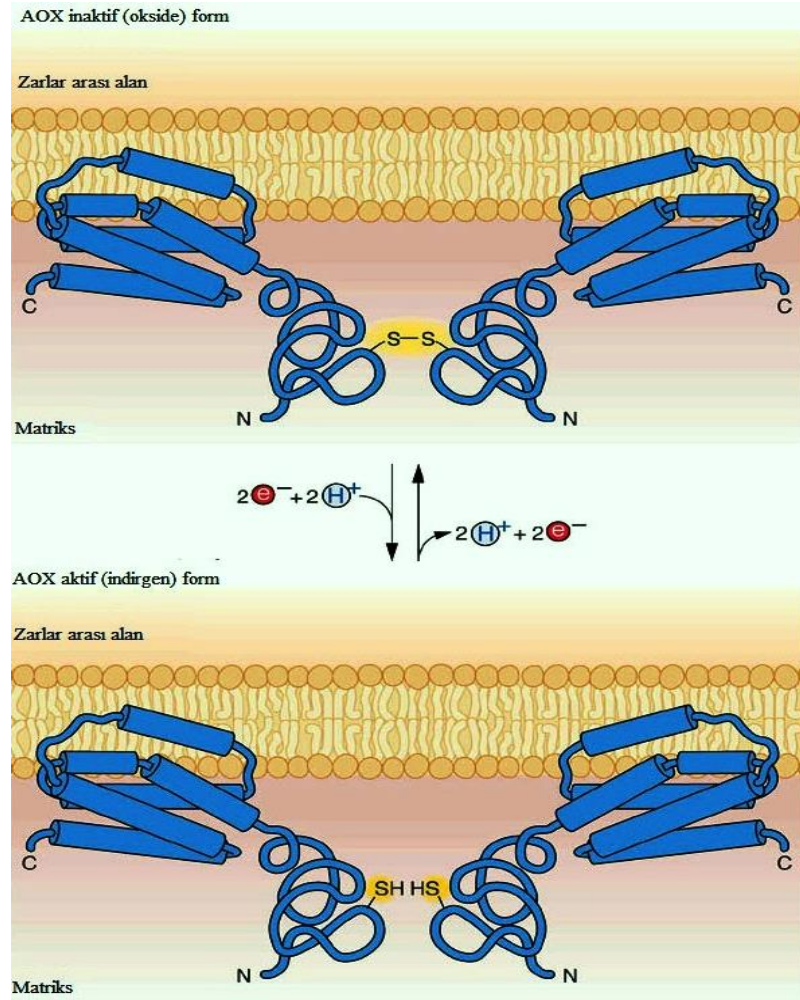
Enerjiyi paylaşan sistem olarak alternatif solunum yolu ve AOX enzimi, ilk kez termojenik bitkilerde keşfedilmiş ve sitokrom yolunun aksine siyanide ve antimonide

dirençli olduğu belirlenmiştir (Meeuse 1975). Daha sonra yapılan çalışmalarda, bitkilerin yanısıra bazı protistler, mantarlar ve alglerin de tek bir terminal oksidazdan oluşan alternatif solunum yoluna sahip oldukları bildirilmiştir (Vanlerberghe and McIntosh 1997).

Bitkilerle yapılan ilk çalışmalarda, *Arum maculatum* bitkisinde polinasyon süresince AOX' un aktif olduğu apendiks bölgesindeki sıcaklığın, hava sıcaklığından 15°C daha yüksek olduğu tespit edilmiş, bu nedenle AOX'un fizyolojik rolünün termojenik bitkilerde polinasyon için ısı üretimi olduğu düşünülmüştür (Meeuse 1975).

Alternatif solunumun genetik temeli ilk olarak *Neurospora* adlı mantarda çalışılmıştır. Bu çalışmadan elde edilen bulgular ışığında; AOX enziminin çekirdekdeki yapısal gen olan *aod1* geni tarafından kodlandığı, regüle edici elementlerin ise yine çekirdekdeki *aod2* genleri tarafından kodlandığı belirlenmiştir (Bertrand *et al.* 1983). Sonraki yıllarda bitkiler üzerinde yapılan çalışmalarda da AOX'un gen ekspresyonunun çekirdek genomu tarafından kodlandığı ortaya çıkarılmıştır (Elthon *et al.* 1989).

AOX yaklaşık 30-35 kDa molekül ağırlığına sahip, hem grubu içermeyen, merkezinde iki demir atomu olan bir enzimdir. Mitokondri iç zarları arasında homo-dimerik olarak heliks şeklinde yerleşmiştir (Umbach and Siedow 1993; Siedow *et al.* 1995). Mitokondri iç zarında dimer olarak bulunan AOX'un inaktif formu, bu dimerlerin birbirine kovalent bağlarla bağlanmış şeklidir (Vanlerberghe *et al.* 1999). Bu kovalent bağların indirgenmesi ile AOX aktif hale geçer (Şekil 1.2) (Umbach and Siedow 1993).

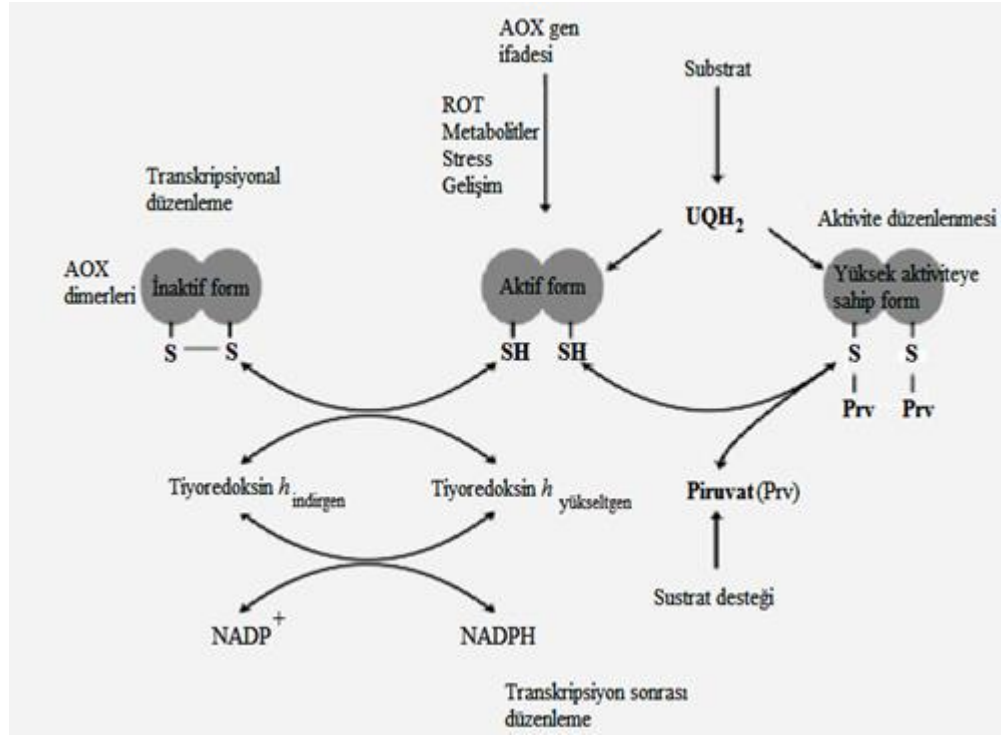


Şekil 1.2. Alternatif oksidazın inaktif ve aktif formları (Anonymous 1989)

Dimerler arasındaki disülfid bağlarının indirgenip, AOX'un aktifleşmesinde tiyoredoksinler görevlidirler (Gelhaye *et al.* 2004). Tiyoredoksinler, hücrede redoks reaksiyonlarını düzenlemede görevli olan küçük proteinlerdir. Her yerde hazır halde bulunan bu proteinler, hem prokaryot hem de ökaryot hemen hemen tüm hücreler de önemli işlevlere sahiptirler (Schürmann and Jacquot 2000; Baughan *et al.* 2002). Bitki mitokondrilerinde de NADPH-Trx ve tioredoksin *o* gibi tioredoksin redüktazların olduğu saptanmıştır (Laloi *et al.* 2001; Lemaire *et al.* 2000).

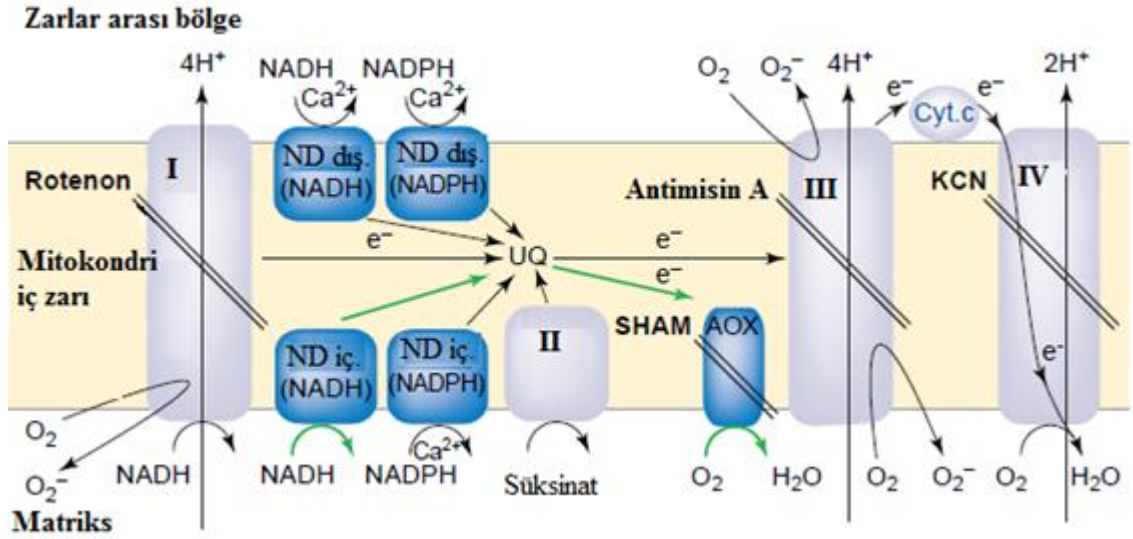
AOX enziminin monomer birimlerinin aktivitesi, piruvat gibi α -keto asitler tarafından daha da artırılır (Millar *et al.* 1993; Pastore *et al.* 2001; Gelhaye *et al.* 2004). Literatürde

piruvatın allosterik etki ile AOX'u aktif hale getirdiğini gösteren çalışmalar mevcuttur (Day *et al.* 1994; Vanlerberghe *et al.* 1995) (Şekil 1.3).



Şekil 1.3. Mitokondride AOX in regülasyonu ve yapısı (Taiz and Zeiger Web 11.3)

AOX aktivitesi, piruvatın aktivatör etkisinin aksine, salisilhidroksamik (SHAM) asit tarafından inhibe edilir. SHAM, indirgenmiş ubikinondan (PQH₂) oksijene elektronların akışını engeller. Bu inhibitörün ve sitokrom yolu inhibitörlerinin kullanılması ile oksijen alınımındaki değişim hesaplanarak AOX aktivitesi tespit edilebilir (Schonbaum *et al.* 1971; Michae 1989) (Şekil 1.4).



Şekil 1.4. Elektron taşıma zinciri komplekleri ve inhibitörleri (Moller 2002).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, alternatif solunumun bazı dokularda ısı üretilmesinin yanısıra, strese maruz kalan bitkilerde hücre içi ROT'ların üretilmesinde de önemli bir sınırlandırıcı etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Purvis 1997; Wagner and Moore 1997). İyi bilinmektedir ki; bitkiler ROT'ların zararlı etkilerinden kendilerini korumak ve hücre, doku ve organ seviyesinde ki hasarları en aza indirmek zorundadırlar. Bu nedenle antioksidan sistem olarak adlandırılan bir savunma sistemine sahiptirler (Lee and Lee 2000; Li and Zu 2000; Zhang 2004). Bu sistem, enzimatik ve non-enzimatik antioksidan sistem olarak iki gruba ayrılır. Enzimatik antioksidanlar yani diğer bir deyişle antioksidan enzimler, bir yandan ROT'ların oluşumunu engellerken, diğer taraftan oluşan ROT'ların kademe kademe daha az zararlı bileşiklere indirgenmesini ve son olarak suya kadar detoksifiye edilmesini sağlar. Bitkilerdeki antioksidan enzimlerin başlıcaları süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), peroksidaz (POD), askorbat peroksidaz (APX) ve glutatyon peroksidaz (GR) enzimleridir (Foyer 1993). Savunma sisteminin ikinci grubu oluşturan non-enzimatik antioksidanlar ise iki gruba ayrılırlar (Elstner 1991). Bunlardan ilki tokofenoller gibi yağda çözünen bileşikler (McKersie 1991), ikinci grup ise askorbik asit ve glutatyon gibi suda çözünen indirgeyicilerdir (Levitt 1980). Non-enzimatik antioksidanlar da enzimler gibi ROT'ların oluşumunun engellenmesinde rol oynamalarının yanı sıra, oluşan ROT'ların detoksifikasyonunda da doğrudan veya dolaylı olarak rol oynarlar. Yapılan çalışmalarda stres şartlarına

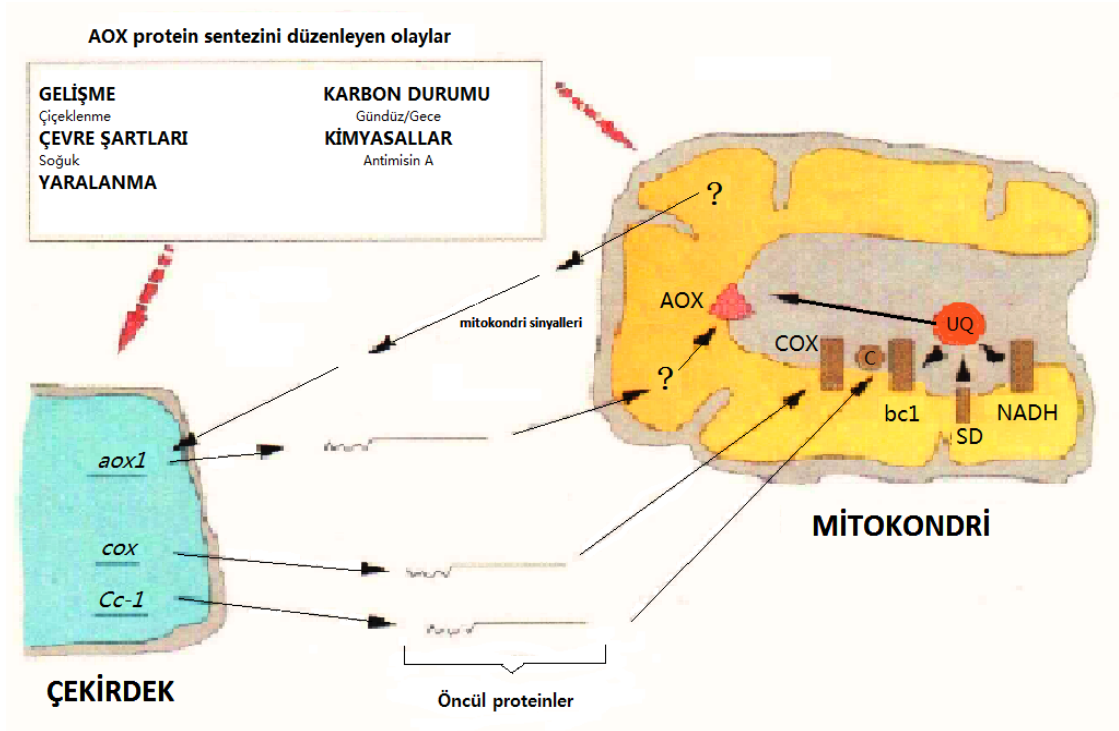
toleranslı olan bitkilerin hassas olanlara kıyasla daha etkili antioksidan savunma sistemine sahip oldukları bildirilmiştir (Walker and McKersie 1993; Dipierro and Leonardis 1997).

Bitki mitokondrilerinde ROT'ların kaynağı, süperoksit radikalının üretildiği kompleks I ve kompleks III'tür. Süperoksit radikalının artması, onun metabolik ürünü ve yine bir toksik madde olan hidrojen peroksitin birikmesine yol açar (Braidot *et al.* 1999; Navrot *et al.* 2007). Yüksek süperoksit ve hidrojen peroksit seviyeleri ise Fenton ve Haber-Weis gibi reaksiyonların meydana gelmesini uyarıp, biyolojik sistemler için en zararlı radikal olan hidroksil anyonunun ($\cdot\text{OH}$) oluşumuna yol açar. Normal şartlarda, antioksidan sistemler tarafından mitokondride ROT'ların miktarı düşük tutulur (Navrot *et al.* 2007; Blokhina and Fagerstedt 2010). Ancak stres şartlarında membran içeriklerindeki değişiklikler nedeni ile sitokrom yolu solunumunda kısıtlanmalar meydana gelir ve ROT oluşumu tetiklenir. Bu gibi durumlarda, elektron zincirindeki akışın engellenmesini önlemek ve toksik ROT oluşumunu indirmek için alternatif yol olan AOX enzimi aktifleşerek ubikinondan elektronları alır ve oksijene iletir suyun oluşmasını sağlar. Böylece hem zincirin akışının devamlılığında, hem de ROT oluşumunun azalmasında önemli işlev görür (Moller and Kristensen 2004). Ayrıca, AOX üzerinden geçen her dört elektron için bir su molekülü olduğundan, organel içi oksijen-su konsantrasyonu korunması da sağlanmış olur (Siedow and Moore 1993; Maxwell *et al.* 1999).

AOX'un zincir üzerindeki bu etkisison derece önemlidir. AOX'un sunmuş olduğu bu alternatif yol ile karbon metabolizması, elektron geçişi ve ATP döngüsü arasındaki tıkanıklık giderilmiş olur. Böylece karbon iskeleti, ATP ve indirgenmiş güç desteğine ihtiyacı olan diğer metabolik süreçler ile solunum arasındaki entegrasyonun sağlanmasına ve solunumun optimize edilmesine katkı sağlar (Finnegan *et al.* 2004; Vanlerberghe *et al.* 2009). Ayrıca, NADH ve ATP düzeyinin aşırı derecede artması sitokrom yolunun tıkanmasına sebep olacağından, AOX'un bu tıkanıklığı gidermesi TCA döngüsünün de potansiyel olarak zarar görmesini engeller (McIntosh 1994).

Yukarıda belirtilen özelliklerinin ışığı altında, strese maruz kalmış bitkilerde AOX'un ekspresyonu ve aktivitesindeki değişimleri belirlemek üzere çeşitli çalışmalar yapılmış ve gerek biyotik gerekse abiyotik streslerin büyük bir bölümünün AOX proteini ekspresyonundan sorumlu olan farklı genlerin teşvik edilmesine neden olduğu tespit edilmiştir (Simons and Lambers 1999; Finnegan *et al.* 2004; Vanlerberghe *et al.* 2009).

AOX'un protein ifadesiyle enzim aktivitesi stres olmayan durumlarda genellikle düşüktür. Yapılan çalışmalar soğuk stresi (Vanlerberghe and McIntosh 1992a; Purvis and Shewfelt 1993), patojenik saldırı (Lennon *et al.* 1997; Simons *et al.* 1999), fosfat iyonu eksikliği (Juszczuk *et al.* 2003), yaralanma, salisilik asit düzeyinin artması, etilenin eklenmesi (Meeuse 1975; Laties 1982; Moore and Siedow 1991), yaşlanma (Hiser and McIntosh 1990) ve sitokrom yolunun inhibisyonu (Vanlerberghe and McIntosh 1992a; Prasad *et al.* 1994) gibi koşullarda AOX'un ifadesinde belirgin artışların meydana geldiğini göstermiştir. AOX'un protein ifadesinde belirlenen artışlara paralel olarak, stres şartlarına maruz kalan bitkilerde AOX genlerinin ekspresyonunda da belirgin artışlar kaydedilmiştir (Simons and Lambers 1999; Finnegan *et al.* 2004; Vanlerberghe *et al.* 2009) (Şekil1.5).



Şekil 1.5. Bitki mitokondrisindeki terminal oksidazlar için potansiyel düzenlenme yolları

*cox; sitokrom oksidazın(kompleks IV) alt ünitelerini kodlayan çekirdeğe ait gen, *Cc-1*, sitokrom oksidazın apoprotein kısmını kodlayan gen. AOX, alternatif oksidaz; c, Cyt c; NADH, NADH dehidrogenaz; SD, suksinat dehidrogenaz; COX, sitokrom c oksidaz (kompleks IV), bcl; sitokrom c redüktaz; UQ, ubikinon (McIntosh 1994).

Diğer yandan, termojenik olmayan bitkilerde de soğuk stresinin AOX aktivitesini artırdığı belirlenmiştir (Vanlerberghe and McIntosh, 1997; McIntosh *et al.* 1998; Zhou and Solomos 1998; Calegario *et al.* 2003). Fiorani *et al.* (2005), 12°C’de yetiştirilen *Arabidopsis* bitkisinde AOX protein miktarının daha sıcak şartlarda yetiştirilenlere göre oldukça yüksek olduğunu belirlemiştir. Ayrıca soğuk şartların AOX mutanı olan bitkiler için daha tehlikeli olduğunu belirlemiştir. Aynı araştırmacılar, düşük sıcaklık altında yetiştirilen transgenik *Arabidopsis* bitkisinde AOX protein düzeyinin, yaprak fenotipinin değişmesinde etkili olduğunu gözlemlemiştir.

Searle *et al.* (2010), sıcak aylara kıyasla soğuk aylarda alp çimenlerinin sitokrom yoluna oranla daha fazla AOX proteinini içerdiğini belirlemiştir. Bu çalışmaya paralel olan farklı çalışmalarda, sıcak ortamlarda gelişen bitkilere kıyasla soğuk ortamlarda gelişen

bitkilerin daha fazla AOX proteini içerdiği belirlenmiştir (Campbell *et al.* 2007; Umbach *et al.* 2009; Wang *et al.* 2011).

Bitkilerin soğuga tolerans mekanizmaları üzerine çalışan birçok araştırmacı, aynı türün hassas ve dirençli çeşitlerinin AOX aktivitelerindeki değişimleri inceleyerek soğuga tolerans üzerine AOX'un etkin olup olmadığını belirlemeye çalışmışlardır. Bu bağlamda, Ribas-Carbo *et al.* (2000) mısırın soğuga toleranslı ve hassas iki çeşidini çalışmış ve hassas olanın alternatif solunum yolunun toleranslı olanagöre daha fazla arttığını gözlemiştir. Araştırmacı bu bulguya dayanarak, genetik olarak soğuga toleranslı olma ile alternatif solunum yolunun ilişkili olmadığı fikrini öne sürmüştür.

Öte yandan Nobuyuki *et al.* (2008), soğuga hassas ve toleranslı iki buğday çeşidiyle yapmış olduğu çalışmada, yukarıdaki araştırmacının bulgularına tam zıt sonuçlar elde etmiştir. Araştırmacılar 22°C'de iki hafta yetiştirildikten sonra 4°C'ye transfer edilen buğday çeşitlerinde, hassas türe oranla toleranslı olanlarda alternatif solunum yolunun çok daha belirgin bir artış gösterdiğini belirlemişlerdir. Yine aynı araştırmacılar toleranslı buğday çeşidinde AOX proteini gen transkripsiyonunun hassas çeşide göre daha yüksek olduğunu tespit ederek, soğuk aklimasyonu ve donma toleransı ile mitokondriyal alternatif solunum yolunun ilişkili olduğu fikrini öne sürmüşlerdir. Oysaki bu çalışmadan elde edilen sonuçlar, daha önceki yıllarda McCain and Hill (1977)'nin kışlık ve yazlık buğday çeşitlerindeki alternatif oksidaz kapasitesindeki değişimleri belirlediği çalışmayı destekler nitelikteydi. McCain and Hill (1977), yazlık buğdaya göre kışlık buğdayın daha fazla alternatif oksidaz kapasitesine sahip olduğunu belirlemiş ve soğuga tolerans ile alternatif oksidaz kapasitesi arasında pozitif bir ilişkinin olduğu fikrini öne sürmüşlerdir. Ayrıca bu araştırmacılar, dört farklı buğday kültüründe etiyole yapraklardan elde ettikleri izole mitokondrilerde, alternatif solunum kapasitesinin kültürlere göre kompleks III respirasyon değerinin %8-35 arasında değiştiğini tespit etmişlerdir.

AOX'un rolünü ortaya çıkarmaya yönelik kullanılan yöntemlerden biri de transgenik bitkileri kullanmaktır. Bu bağlamda yapılan bir çalışmada yabancı tip, AOX

expressiyonu baskılanmış tip ve AOX expressiyonu artırılmış tip olmak üzere 3 farklı tütün (*Nicotiana tabacum*) bitkisi 28/22°C ideal yetiştirme ortamından 12/5°C'lik soğuk şartlara aktarılmıştır. Daha sonra bu bitkilerin yaprak dokusunda 24 saat içinde ki AOX1a mRNA ve AOX proteini düzeylerinin yüksek oranda arttığı tespit edilmiştir. Aynı çalışmada, yaprak şeker düzeyinin AOX düzeyindeki artış ile doğru orantılı olarak arttığı da tespit edilmiştir. Bu çalışmada elde edilen diğer önemli bulgu ise AOX ekspresiyonu baskılanmış transgenik bitkilerin lipid peroksidasyon düzeyinin yabani tipe göre anlamlı değerde yüksek olduğudur. AOX ekspresiyonu transgenik olarak artırılmış bitkilerdeki lipid peroksidasyon düzeyinin yabani tip tütün bitkisine kıyasla daha düşük düzeyde olması, strese karşı bitki direncinin artırılmasında AOX'un etkin olduğu varsayımını daha da kuvvetlendirmiştir (Wang *et al.* 2011).

Yabani ve transgenik tütün bitkisi üzerine yapılan farklı bir çalışmada, Maxwell *et al.* (1999) yabani tip ve iki çeşit transgenik (AOX ekspresyonu baskılanmış tip ve AOX ekspresyonu artırılmış) tütün hücre kültürlerine antimisin A uygulaması yapılarak oluşan ROT seviyeleri saptamış ve birbirlerine göre kıyaslanmıştır. Yabani tip tütün bitkisine oranla AOX ifadesi baskılanmış bitkilerde ROT seviyesinin beş kat daha fazla olduğu tespit edilmiştir. AOX ekspresyonu artırılmış olan tütünde ise yabani tipe göre ROT seviyesinin %57 daha az olduğu tespit edilmiştir. Aynı çalışmada, bu üç grup bitkide ki SOD, GPX, CAT gibi antioksidan enzimlerin ifadesini sağlayan genlerin değişimi de belirlemiş ve ROT seviyesindeki değişim ile ilişkilendirilmiştir. Elde edilen bulgulara göre; AOX ifadesi artırılmış türlerde hem antioksidan enzimleri ifade eden genlerinin daha az olduğu, hem de oluşan ROT seviyelerinin diğer bitkilere oranla oldukça düşük olduğu tespit edilmiştir. Aynı araştırmacılar, bitkilere kompleks III inhibitörü olan antimisin A ekledikten sonra zamana göre ROT seviyesindeki değişimleri ölçmüşler ve AOX ifadesi artırılmış bitkilerde artışın çok az olmasına rağmen, AOX ifadesi baskılanmış bitkilerde belirgin derecede fazla olduğunu tespit etmişlerdir. Araştırmacılar bu verilerin ışığı altında, antioksidan mekanizma etkin olmadan da ROT seviyelerinin indirgenmesinde AOX'un etkin olduğunu göstermişlerdir.

Farklı araştırmacılar da, kompleks III inhibitörü olan antimisin A maddesini kullanmak suretiyle AOX ifadesi ve aktivitesi üzerine çalışmalar yapmışlardır. Bilindiği gibi antimisin A, sitokrom yolunun sitokrom *b* ve sitokrom *c₁* arasındaki elektron akışını inhibe eder (Roberts *et al.* 1980). Patates yapraklarına antimisin A uygulamasının AOX proteini miktarında küçük bir artış meydana getirdiği fakat alternatif solunum kapasitesinde değişime neden olmadığı belirlenmiştir. Bu sonucun aksine tütün bitkisi hücrelerine uygulanan antimisin A uygulamasının ise AOX aktivitesinde ciddi artışlara neden olduğu saptanmıştır (Vanlerberghe and McIntosh 1996; Geisler *et al.* 2004).

Tek hücreli bir protist olan *Euglena gracilis*'in yetişme ortamına antimisin A eklenmesinin ardından beş saat içinde siyanide dirençli solunumun uyarıldığı belirlenmiştir (Benichou *et al.* 1988). Benzer etki bir maya türü olan *Hansenula anomala*'da da görülmüş (Minagawa and Yoshimoto 1987) ayrıca aynı mantar türünde antimisin A'nın 36 kDa molekül ağırlığına sahip olan siyanide direnç mekanizmasından sorumlu olduğu düşünülen mitokondrial proteinlerin sentezine yol açtığı tespit edilmiştir (Minagawa *et al.* 1990). Alternatif solunum yolu hasarlı mutant bir mantar türü olan *Neurospora crassa*'nın kültür ortamına antimisin A eklenmiş, ancak alternatif solunum teşvik edilmediği gözlenmiştir. Bu araştırmaların sonucu olarak, antimisin A'nın sitokrom yolu inhibitörü olmasının yanı sıra, aynı zamanda alternatif solunum yolu uyarıcısı olduğu da belirlenmiştir (Bertrand *et al.* 1983).

Benzer şekilde Vanlerberghe and McIntosh (1992b) adlı araştırmacılar da tütün (*Nicotiana tabacum*) bitkisinde yaptıkları çalışma ile antimisin A maddesinin sitokrom yolu ve alternatif solunum yolu üzerine etkisini araştırmışlardır. Araştırmacılar, hücre kültürü ortamına 2M antimisin A eklendikten hemen sonra sitokrom yolunun %95 oranında inhibisyona uğradığını ve bu inhibisyonun yaklaşık 12 saat aynı şekilde kaldığını tespit etmişlerdir. Diğer yandan antimisin A eklenmesinden 12 saat sonra ölçülen alternatif solunum yolunun ise yaklaşık 3,5 kat arttığını tespit etmişlerdir. Uygulamanın 12. saatinden sonra sitokrom yolunun yeniden aktif olmaya başladığı ve 48. saatte yeniden antimisineski seviyelerine ulaştığı belirlenmiştir. Sitokrom yoluna paralel olarak, alternatif solunum yolu aktivitesinin de uygulamadan 12 saat sonra tekrar

düşüşe geçip antimisin A uygulaması yapılmadan önceki aktivite değerlerine gerilediği gözlemlenmiştir. *In vivo* ortamlarında yaptıkları bu gözlemi izole mitokondrilerde de tekrarlayan bu araştırmacılar, elde ettikleri sonuçların *in vitro*'dan elde edilenlerle paralellik gösterdiğini tespit etmişlerdir. Çalışmadan elde ettikleri bulguları desteklemek için antimisin A eklenmesinden beş saat sonra AOX protein miktarında ki değişimler de ölçülmüş ve alternatif solunum yolu hızındaki artışı destekler içimde AOX protein içeriğinde de dikkate değer artışın olduğunu belirlenmiştir. Antimisin A ile birlikte RNA sentezi inhibitörü aktinomisin D ve hücre içi protein sentezi inhibitörü sikloheksimidenin hücre kültürü ortamına eklenmiş ve 8 saat sonra yapılan immunolojik saptamada AOX protein miktarında herhangi bir artış olmadığı tespit edilmiştir. Araştırmacılar bu bulgular ile antimisin A'nın sadece AOX aktivitesini değil, aynı zamanda AOX proteinlerinin *de novo* sentezini de önemli oranda artırdığını açıkça göstermişlerdir (Vanlerberghe and McIntosh 1992b).

Pirinç bitkisinde yapılan çalışmada ise köklerde düşük konsantrasyonlarda sitokrom yolu inhibitörlerinden olan sodyum azid (NaN_3) uygulanmış ve siyanide dirençli respirasyon değerinin 6 saat içinde önemli miktarda arttığı belirlenmiştir (Kano and Kumazawa 1972).

Buğday bitkisi üzerine yapılan bir çalışmada ise dıştan uygulanan H_2O_2 'nin AOX aktivitesini artırdığı belirlenmiş, H_2O_2 ile birlikte SHAM uygulanmasının ise oksidatif hasarın tekrar artmasına neden olduğu görülmüştür. Böylece çalışmadan elde edilen bulgular, AOX proteininin eksojen uygulamalarla artırılabilirliğini ve böylece soğuğa adaptasyon yeteneğinin geliştirilebileceği varsayımını ortaya çıkarmıştır (Feng *et al.* 2008).

Mevcut literatür, alternatif solunum yolu üzerine yapılan çalışmaların son yıllarda ivmeli bir şekilde arttığını göstermektedir. Ancak alternatif solunum yolunu aydınlatmaya yönelik yapılan bu çalışmalar daha çok *in vitro* ortamlarda ve izole edilmiş mitokondrilerde gerçekleştirilmiş ve bu yolun mekanizmasını ve önemini ortaya çıkarmaya odaklanmıştır. Oysaki bitkilerin sahip oldukları bu alternatif yolun neden

olduğu içsel ısı artışı kullanılarak soğuğa tolerans sağlanıp sağlanamayacağı üzerine herhangi bir çalışma yapılmamıştır. Sıcaklıkta sadece 1°C'lik bir artışın bile bitkiler üzerindeki tahribatı dikkate değer biçimde azaltacağı ve bu nedenle ekonomi ve global gıda ihtiyacında büyük bir önem arz edeceği göz önüne alındığında, alternatif yolun aktifleştirilmesi ile bitkilerin soğuğa karşı dirençlerinin artacağı ve ekonomik yönden ürün ve verimlilik kayıplarının azalacağı kuvvetle muhtemeldir. Öte yandan, AOX'un diğer önemli bir etkisi de ROT'ların oluşumunu ve artışını azaltmasıdır. Bu etkisi sayesinde AOX aktivitesinin artırılması ile ROT'ların en önemli üretim merkezlerinden biri olan mitokondrilerde ki ROT oluşumu ile oluşan ROT'ların miktarında önemli indirgenmeler meydana gelecektir.

Bu bilgilerin ışığı altında soğuk stresine maruz kalan bitkilerde AOX'un aktive edilmesi kuvvetle muhtemeldir ki; hem içsel ısı artışına neden olacak, hem de stresin etkisiyle artması muhtemel olan ROT'ların oluşumunu ve miktarlarını önemli derecede indirgeyecektir. Bu nedenle çalışmamızda AOX'un aktivitesini artıran maddeler kullanılarak bu soğuk stresine karşı bitki direncinin artırılması hedeflenmiştir. Bu doğrultuda mevcut araştırmamız için ekonomik değeri yüksek olan buğday ve nohut bitkileri kullanılmıştır. Bu bitkilerin alternatif solunum yollarını aktive etmek için çeşitli solunum inhibitörleri (solunum inhibitörleri alternatif solunumu teşvik eder) ile doğrudan AOX aktivatörü olan piruvat optimize edilmiş konsantrasyonlarda uygulanmış ve soğuğa tolerans üzerine etkileri belirlenmeye çalışılmıştır. Elde edilen bulguları doğrulamak için, farklı bir grup olarak bitkilere de AOX inhibitörü olan SHAM uygulaması yapılmış ve soğuğa direnç üzerine AOX'un etkisi doğru bir şekilde değerlendirilmeye çalışılmıştır.

Literatürde solunum inhibitörleri ile AOX aktivatörlerinin bitkilere direkt olarak uygulanması ile soğuğa toleransın artırılmasına yönelik herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Mevcut araştırma bu yönüyle de literatür için bir ilk teşkil etmiş olacaktır.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. Reaktif Oksijen Türleri

Atomlarda elektronlar orbital adı verilen bölgede çift olarak bulunurlar. Moleküllerin çoğu çift elektronlu olmasına karşın az miktarda da olsa bir veya daha fazla eşleşmemiş elektrona sahip olan moleküllerde vardır. Eksik elektronlu, molekül ağırlığı düşük, kısa ömürlü ve kararsız olan bu moleküller bulabilecekleri herhangi bir molekül ile etkileşime girerek bu molekülden ya bir elektron alır ya da bir elektron verirler. Başka moleküllerle kolayca elektron alış-verişine girerek onların yapısını bozan bu moleküllere serbest radikaller, oksidan moleküller ya da reaktif oksijen partikülleri' adı verilir. Reaktif oksijenler iki gruba ayrılırlar;

Radikaller : Tek elektron eksikleri nedeniyle başka moleküller ile kolayca elektron alış-verişine giren oksidanlardır. Örneğin; Süperoksit radikali, hidroksil radikali.

Nonradikaler : Elektron eksikleri olmadığı halde başka moleküllerle radikallerden daha zayıf şekilde birleşebilen oksidanlardır. Örneğin; Hidrojen peroksit (Genişel 2010).

2.1.1. Singlet oksijen ($^1\text{O}_2$)

Oksijenin yüksek enerjili formudur. Singlet oksijen, eşleşmiş iki elektron aynı orbitalde veya farklı orbitallerde zıt spinler halinde bulduklarında oluşur. Eşleşmemiş elektronu bulunmadığı için radikal özelliği yoktur, ancak oksidan özelliği oldukça yüksektir. Singlet oksijen çok çeşitli yollarla kimyasal veya fotokimyasal olarak üretilebilir. Bitkilerde singlet oksijenin üretildiği en iyi bilinen yol fotokimyasal olup, fazla miktarda ışık enerjisi absorblayan klorofilden oksijene enerji aktarılmasıyla ilgilidir. Yani asıl kaynağı fotosentez reaksiyonlarında elektron transport sistemindeki klorofil pigmentleridir (Foyer *et al.*1997; Güler 2008). Singlet oksijen diğer moleküllerle etkileştiğinde ya içerdiği enerjisi transfer eder, ya da kovalent tepkimelere

girer. Özellikle karbon-karbon çift bağları singlet oksijenin tepkimeye girdiği bağlardır. $^1\text{O}_2$ birçok organik molekülle reaksiyona girdiğinden yüksek oranda yıkıcıdır ve canlı organizmada hasara neden olan başlıca oksijen türlerinden biridir (Cadenas 1989; Durmuş 2003). Doymamış yağ asitleri ile de doğrudan tepkimeye girerek peroksit radikalini oluşturur ve $\cdot\text{OH}$ kadar etkin bir şekilde lipid peroksidasyonu başlatabilir. Hücre zarlarının glikolipid, fosfolipid, sterol ve gliserid yapısındaki doymamış yağ asitleriyle reaksiyona girerek peroksitler, aldehitler, hidroksi yağ asitleri ve pentan gibi çeşitli lipid peroksidasyon ürünlerini oluştururlar (Gechev *et al.*2002; Minibaeva and Gordon 2003; Mutlu 2009; Erdal 2010).

2.1.2. Süperoksit radikali ($\text{O}_2^{\cdot-}$)

Kimyasal formülü $\text{O}_2^{\cdot-}$ olan ve oksijenin bir elektron alarak indirgenmesiyle hızlı bir şekilde oluşan bir anyondur. Süperoksit radikali enzimatik ya da enzimatik olmayan reaksiyonlarla meydana gelebilir. Bu radikal oldukça reaktiftir ve lipidlerin yanı sıra diğer biyokimyasal bileşenlerin de oksidasyonuna sebep olur. Bu radikalın lipidperoksidasyonu, membran hasarı, hücrel toksisite ve DNA'daki tek zincir kırıklarına sebep olduğu belirtilmiştir (Fridovich 1995; Mutlu 2009). Süperoksit radikali hidrojen peroksitle reaksiyona girerek çok daha toksik bir molekül olan hidroksil radikalini üretebilir. Haber-Weiss reaksiyonu olarak bilinen bu reaksiyon demir ve bakırgibi metallerin katalizörlüğünde oldukça hızlı gerçekleşir. Süperoksit radikali, yüksek katalitik etkiye sahip süperoksitdismutaz (SOD) enziminin etkisiyle dismutasyona girerek konsantrasyonu azaltılır (Halliwell 1984; Güler 2008; Mutlu 2009; Erdal 2010).

2.1.3. Hidrojen peroksit (H_2O_2)

Oksijenin enzimatik olarak iki elektron ile indirgenmesiyle ya da süperoksitlerin enzimatik veya enzimatik olmayan dismutasyon tepkimeleri sonucu oluşurlar. Süperoksitin enzimatik olmayan yıkımı nötral ve hafifçe asidik pH'da kendiliğinden, enzimatik yıkımı ise süperoksit dismutaz enzimi tarafından gerçekleştirilir. Süperoksitin

oluştığı yerlerde (peroksizomlar, elektron taşıma zinciri, plazma membranı, ekstraselülmatriks) önemli miktarda H_2O_2 'de üretilir (Slesak *et al.*2007). Zayıf bir asit olmasına karşın güçlü oksidasyon özelliğine sahiptir. Yapısında paylaşılmamış elektron içermediğinden radikal özellik taşımaz. Radikal olmadığı halde H_2O_2 'nin oksitleyici bir tür olarak bilinmesinin nedeni demir ve bakır gibi metal iyonlarının varlığında serbest oksijen radikalleri içinde en yüksek derecede toksisiteye sahip olan hidroksil radikalının öncülü olarak davranmasıdır. H_2O_2 özellikle proteinlerdeki hem grubunda bulunan demir ile tepkimeye girerek yüksek oksidasyon düzeyindeki reaktif demir formlarını oluşturur. Bu formdaki demir çok güçlü oksitleyici özelliklere sahip olup, hücre zarlarında lipidperoksidasyonu gibi radikal tepkimeleri başlatabilir. Oksitleyici özelliği nedeniyle biyolojik sistemlerde oluşan H_2O_2 'nin ortamdaki uzaklaştırılması gerekir (Halliwell 1984; Güler 2008). Bu görevi katalaz ve peroksidaz gibi antioksidan enzimler H_2O ve O_2 gibi ürünlere dönüştürerek yerine getirir. Oksidatif streslere tolerans sağlamada bitkilerin bu enzimlerin hücrese seviyelerini düzenlemesi oldukça önemlidir (Gechev *et al.* 2002; Minibaeva and Gordon 2003; Mutlu 2009; Erdal 2010).

2.1.4. Hidroksil radikali ($\cdot OH$)

Oksijen radikalleri içerisinde en reaktif ve bilinen en potansiyel oksidanttır. Nötral formları hidroksit iyonları olan bu radikaller kısa ömürlü ve yüksek derecede reaktiftirler. Bir hidrojen atomuyla kovalent bağlı bir oksijen atomundan oluşur. Yarılanma ömürleri çok kısa olan hidroksil radikalleri, iyonlaştırıcı radyasyonun (X ışınları) etkisiyle su moleküllerinin homolitik kırılması sonucunda oluştuğu gibi hidrojen peroksit molekülünün metaller ile reaksiyonu sonucunda eksik indirgenmesi ile de oluşabilir (Stahl and Sies 2002; Mutlu 2009). Biyolojik sistemlerin tanıdığı en reaktif tür olan $\cdot OH$, su dahil rastladığı her molekülle tepkimeye girebilir. Bütün bu tepkimeler $\cdot OH$ 'in paylaşılmamış elektron içeren dış orbitaline elektron alma ilgisinden kaynaklanır (Halliwell1984). Hidroksil radikalının sebep olduğu en önemli hasar, lipidperoksidasyonu olarak bilinen serbest radikal zincir reaksiyonudur. $\cdot OH$ 'in başlıca hedefi yağ asitleri olup zar lipidlerininperoksidasyonu ile zarın yapısını bozar ve

geçirgenliğini artırıp hücre ölümüne sebep olabilir (Nishiyama *et al.*1998; Güler 2008; Erdal 2010).

2.2. Lipid Peroksidasyonu

Reaktif oksijen türleri (ROT) lipid, protein, karbohidrat ve nükleik asitler gibi hücrelerin temel bileşenleri üzerinde etkili olurlar. Özellikle çift bağların bulunduğu doymamış yağ asitlerini içeren lipidler, ROT ile kolayca reaksiyona girmektedirler. Membran yapısı ve fonksiyonu üzerinde ROT'ların etkilerinin en çok araştırılanlarından birisi lipid peroksidasyonudur. Membranlardaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları, serbest radikallerle kolayca reaksiyon vererek peroksidasyon ürünlerini oluştururlar. Çoklu doymamış (poliansatüre) yağ asitlerinin oksidatif yıkımı, lipid peroksidasyonu (LPO) olarak bilinir ve oldukça zararlıdır. Çünkü kendi kendini devam ettiren zincir reaksiyonu şeklinde ilerler. LPO ile oluşan membran hasarı geri dönüşümsüzdür (Akkus 1995). Biyolojik sistemlerde LPO'yu başlatan serbest radikallerin, süperoksit anyonu ile özellikle hidroksil radikali olduğu kabul edilmektedir. Serbest radikal etkisi ile yağ asidi zincirinden hidrojen atomunun uzaklaşması, bu yağ asidinin radikal özelliği kazanmasına neden olmaktadır. Molekül içi konjuge edilen bağlarının farklı pozisyonlara gelmesi ile değişikliğe uğrayabilen kararsız lipid radikalinin moleküler oksijenle tepkimesi sonucu lipid peroksit radikali meydana gelir (Spiteller 2001; Kuru 2007; Erdal 2010). Oluşan lipid radikali dayanıksız bir bileşiktir. Lipid hidroperoksitlerinin yıkımı ile oluşan ve biyolojik olarak reaktif olan aldehitler ya hücre düzeyinde metabolize edilirler ya da başlangıçtaki etki alanlarından diffüze olup hücrenin diğer bölümlerine hasarı yayarlar. Üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonunda, malondialdehid (MDA) meydana gelir (Yılmaz ve Ozan 2003). MDA yağ asidi oksidasyonunun spesifik yada kantitatif bir indikatörü değildir, fakat lipid peroksidasyonunun derecesi ile iyi bir korelasyon gösterir. Bu sebeple organizma da oluşan LPO düzeyini ölçmek için MDA seviyelerinin ölçümü sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. MDA, tiobarbitürik asit ile pembe renkli bir kompleks oluşturmakta ve oluşan bu çözeltinin absorbans değerlerinden LPO'nun derecesi saptanmaktadır (Yılmaz ve Ozan 2003; Kuru 2007; Erdal 2010).

2.3. Antioksidan Enzimler

ROT miktarını kontrol etmek ve stres koşullarında hücreleri ROT etkisinden korumak için hücreler ROT'u temizleyen bazı enzimler ihtiva ederler. Antioksidan enzimler olarak adlandırılan bu enzimler reaktif oksijen türlerini kademeli bir şekilde daha az toksik olan bileşiklere parçalayarak temizlerler.

2.3.1. Süperoksid dismutaz (SOD) (EC 1. 15. 1. 1)

İlk defa Mann and Keilis (1938) tarafından izole edilen bu enzim McCord and Fridovich (1969) tarafından katalitik fonksiyonu tesbit edilinceye kadar indofenoloksidaz, tetrazoliumoksidaz, eritrocuprein gibi isimlerle anılmıştır. SOD, süperoksid radikalının ($O_2^{\cdot-}$), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizleyen metal içeren bir enzimdir (Sairam and Srivastava 2000; Eyidogan *et al.* 2003; Minibaeva and Gordon 2003).



SOD, süperoksidin parçalanmasını sağlayarak metallerin katalizlediği Haber-Weiss reaksiyonuyla hidroksil radikali oluşma riskini azaltır. ROT'a karşı antioksidan savunma sisteminin ilk hattı olan ve bütün aerobik organizmalarda ve aktifleşmiş oksijen üreten bütün hücre alt yapılarında bulunan bu enzimin aktivitesinin çeşitli streslere cevap olarak arttığı ve bu artışların strese karşı dirençle bağlantılı olduğu belirlenmiştir (Bowler *et al.* 1991; Van Camp *et al.* 1994; Foyer *et al.* 1997; Apel and Hirt 2004). SOD'un üç farklı izoenzimi; bakır/çinko (Cu/ZnSOD), mangan (MnSOD) ve demir (FeSOD) izoenzimleri olup KCN ve H_2O_2 'ye duyarlılıklarına bağlı olarak belirlenirler ve hücre alt yapılarındaki dağılımları farklıdır. MnSOD her iki inhibitöre dirençli olup prokaryotik organizmalar ve ökaryotik hücrelerin mitokondrisinde, Cu/ZnSOD her iki inhibitöre duyarlı olup yüksek bitkilerin hem sitoplazma hem de kloroplastlarında (Scandalios 1993; Güler 2008), FeSOD ise, H_2O_2 'ye duyarlı, KCN'ye

dirençli olup, bazı bitki türlerinin kloroplastlarında ve prokaryotik organizmalarda bulunabilirler (Bowler *et al.* 1992; Güler 2008). Ancak bu enzimin tek başına strese karşı yeterli olamayacağı da bildirilmiştir (Pitcher *et al.* 1991; Erdal 2010).

2.3.2. Peroksidaz (POD) (EC 1.11.1.7)

Peroksidazlar, SOD ve CAT ile koordineli olarak ROT'ların temizlenmesinde önemli rol oynayan, çoklu moleküler formlara ve geniş bir hücre altı dağılımına sahip, hem grubu ihtiva eden oksidaz grubu enzimlerdir. POD'lar H₂O₂'yi kullanarak fenoller ve hidrokinonlar gibi çok sayıda aromatik bileşenlerin dehidrojenasyonunu katalizlerler (Bergmeyer and Grabl 1983). Bitki peroksidazları, protein kısmına bağlanan ve enzimin kararlılığında etkisi olan oligosakkarit zincirlerinin varlığı ile karakterize edilen glikoproteinlerdir (Hu and Van Huystee 1989). Peroksidazların pek çok fizyolojik olayla ilişkisi olduğu ve metabolizmada aktif bir rol oynadığı belirlenmiştir (Durmuş 2003). Stres altındaki bitkilerde peroksidaz aktivitesinin arttığı bilinmektedir (Asada 1992a). POD, elverişsiz çevresel faktörler altında üretilen zararlı oksijen radikallerinin seviyesini düzenler ve bitki hücrelerinin en önemli koruyucu enzimlerinden birisidir (Bakardjieva and Christov 1996). Molekül ağırlıkları 35-100 kDa arasında değişmektedir. POD'lar hidrojen vericisi olarak birçok organik ve inorganik substratı (AH₂) kullanarak H₂O₂'yi temizlerler. POD enziminin katalilediği reaksiyon aşağıda şematize edildiği gibidir.

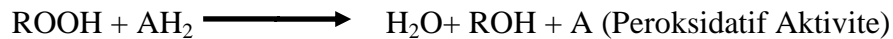
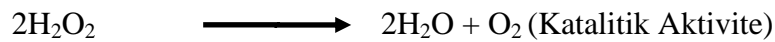


POD'lar oksin katabolizması, hücre duvarı proteinlerinin bağlanması ve pektinlerin çapraz bağlanması gibi birçok metabolik süreçte de etkili olurlar. Sonuç olarak peroksidazlar hidrojen peroksidi kontrol altında tutarak hücre duvarının yapısına katılmasını sağlarlar. Mekanizmaları henüz tam olarak aydınlatılamamış olmasına rağmen, çeşitli stres faktörlerinden yüksek seviyede etkilenen POD aktivitesi, bu enzimin stres enzimi olarak anılmasına sebep olmuştur (Whetten *et al.* 1998; Amaya *et al.* 1999; Rout *et al.* 2000; Jaleel *et al.* 2007; Mutlu 2009; Erdal 2010).

2.3.3. Katalaz (CAT) (EC 1. 11. 1. 6)

Tabiatta çok yaygın dağılım gösteren bu enzimler, aerobik mikroorganizmaların hepsinde, omurgalılarda, omurgasızlarda, bitkilerde ve mantarlarda bulunmaktadır (Bergmeyer and Grabl 1983). CAT, aktif bölgesinde Fe⁺³ atomuyla birlikte hem grubu ihtiva eden, yüksek molekül ağırlığına sahip antioksidan bir enzimdir. Her birinde yaklaşık 500 aminoasit içeren 4 polipeptit zincirinden oluşan bir tetramerdir. En yüksek hızla reaksiyon veren enzimlerden biridir. Bir molekül katalaz bir saniyede milyonlarca hidrojen peroksit molekülünü su ve oksijene dönüştürür.

CAT'ın bitki dokularında H₂O₂'nin uzaklaştırılmasında önemli rol oynadığı belirtilmiştir (Patykowski and Urbanek 2003). CAT'ın temel fonksiyonu, moleküler O₂ mevcudiyetinde metabolizmanın bazı kademelerinde sentezlenen, radikal karakterli H₂O₂'nin ve ROOH gibi bir peroksin radikalliğini gidererek özellikle membranlarda oluşabilecek geri dönüşümsüz hasarları engellemektedir. Zira H₂O₂, singlet oksijen (¹O₂) ve hidroksil radikallerinin (•OH) potansiyel kaynağıdır (Scandalios 1993; Chaudiere and Ferrari 1999). CAT, solunum zincirinde oksijenin eksik indirgenmesinden oluşan H₂O₂'yi O₂'ye indirger (Chaudiere and Ferrari 1999).



CAT kararlı bir enzim değildir. Yüksek ışık yoğunluğu ve strese maruz kalan bitki hücrelerinde oluşan H₂O₂'nin yüksek konsantrasyonlarıyla inhibe edilebilir (Streb *et al.*1993). H₂O₂'ye olan zayıf afinitesi ve sadece peroksizomlarda bulunması (çok az miktarda mitokondri matriksinde bulunurlar) CAT'ın etkinliğini azaltmaktadır (Asada 1992a; Scandalios 1993). CAT'ın koruyucu işlevi askorbik asit, glutatyon, E ve K vitaminleri tarafından güçlendirilir. Çünkü bu bileşikler kolayca elektron alabilir ve

serbest radikalın ortadan kaldırılmasıyla yakalayıcı fonksiyon üstlenebilirler (Keha and Küfrevioğlu 2000; Taşğın 2004; Erdal 2010).

2.3.4. Askorbat peroksidaz (APX) (EC 1. 11. 1. 11)

İki molekül askorbat kullanarak hidrojen peroksiti suya dönüştüren antioksidan enzim askorbat peroksidazlar (APX)'dir (Noctor and Foyer 1998). Bu reaksiyon sonucunda askorbat iki molekül monodehidroaskorbata (MDHA) dönüşür. MDHA monodehidroaskorbat redüktaz tarafından tekrar askorbata dönüştürülür (Kumar *et al.* 2011). APX bitki hücrelerinde tilakoid ve mikrozomal mebranlara bağlı formlara, sitoplazmada ve stromada çözülmüş formlarda ve apoplast da olmak üzere en az beş izoformu vardır (Yamaguchi 1995; Noctor and Foyer 1998). APX'in izoformları elektron verici olarak askorbat için spesifik olup, askorbatın yokluğunda aşırı derecede kararsızdırlar (Miyake ve Asada 1996). Sitoplazmada bulunan askorbat peroksidazlar, kloroplastakine benzer ancak askorbat yokluğunda daha fazla kararlı olup askorbattan başka elektron vericilerini de kullanabilir (Ranieri *et al.* 1996; Vanacker *et al.* 1998; Güler 2008). Askorbat peroksidazlar yaygın şekilde çalışılan guaiakol peroksidazlara benzemesine rağmen H⁺ vericisi olarak askorbata olan yüksek afinitelerinden dolayı aralarında farklılıklar vardır (Nakano and Asada, 1987; Güler 2008).

2.3.5. Glutatyon redüktaz (GR) (EC 1. 6. 4. 2)

NADPH'ı elektron verici olarak kullanan oksitlenmiş glutatyonun (GSSG), glutatyona (GSH) indirgenmesini katalizleyen enzim glutatyon redüktaz (GR, EC 1.6.4.2) enzimidir (Ranieri *et al.* 2005; Yannarelli *et al.* 2007).



GSH'nin antioksidan özelliğinden dolayı, glutatyon redüktaz hücrenin antioksidan kapasitesinin devamlılığı için önemlidir (Meister 1983; Creissen *et al.* 1994; Güler

2008). GR askorbat glutatyon döngüsünde GSH/GSSG oranını yüksek tutarak hücreleri oksidatif hasara karşı korumada görevli anahtar enzimlerden biridir (Foyer and Noctor 2005). GR diğer enzimlerle birlikte H_2O_2 'nin radikal özelliğinin ortadan kaldırılmasında görev alır. Oksitlenmiş askorbik asiti (dehidroaskorbat) tekrardan askorbik asite indirgeyen dehidroaskorbat redüktaz (DHAR) enzimi sustrat olarak GSH'ı kullanmakta ve reaksiyon sonucu GSSG oluşmaktadır. Oluşan GSSG, GR enzimiyle tekrardan GSH'a indirgenir ve böylece dehidroaskorbat redüktaz enziminin substratı yeniden oluşur. Ayrıca GR enzimi GSSG'yi GSH'a indirgerken, NADPH'ı kullanmakta ve böylece CO_2 fiksasyonu sınırlandığı durumlarda, NADPH/NADP+ oranının dengelenmesine yardımcı olmaktadır. Bu nedenle GSSG'nin GSH'a indirgenmesi, oksidan temizlenmesinde önemli bir basamaktır ve oksidatif strese karşı savunmada GR'nin önemini ortaya çıkarmaktadır (Aono *et al.* 1995; Creissen *et al.* 1996; Güler 2008).

2.4. Antioksidan Bileşikler

2.4.1. Glutatyon

Glutatyon (GSH), hayvan hücrelerinin hemen hemen hepsinde yüksek konsantrasyonlarda bulunur. Bitkilerde ise özellikle yapraklarda milimolar düzeyindeki konsantrasyonlarda bulunan genel bir indirgeyicidir (Rennenberg and Lamourex 1990; Güler 2008). Bitkilerde glutatyonun sülfür metabolizmasında ve oksidatif savunmada önemli fizyolojik rolleri vardır. Glutatyon protein yapısında olmayan tiyoller içerir ve köklerden sülfür alınımını düzenler (Herschbach *et al.* 1994). Glutatyon ksenobiyotiklerin detoksifikasyon mekanizmasında görev alan GSH S-transferaz enzimi tarafından kullanılır. Ayrıca bitki ağır metallerinin düzeyini kontrol altında tutan fitoşelatinlerin öncül bileşiğidir (Grill *et al.* 1989; Rauser 1987; Scheller *et al.* 1987). GSH hem bitki hem de hayvanlarda bir redoks tamponu ve antioksidandır (Foyer and Halliwell 1976; Kunert and Foyer 1993; Law *et al.* 1983; Meister 1994). GSH'ın yapısındaki sisteinin sülfidril grubu antioksidan fonksiyonunda etkilidir. GSH'daki tiyol grubunun oksitlenmesi oluşan GSSG, antioksidan özelliğini kaybeder. GSH, kimyasal

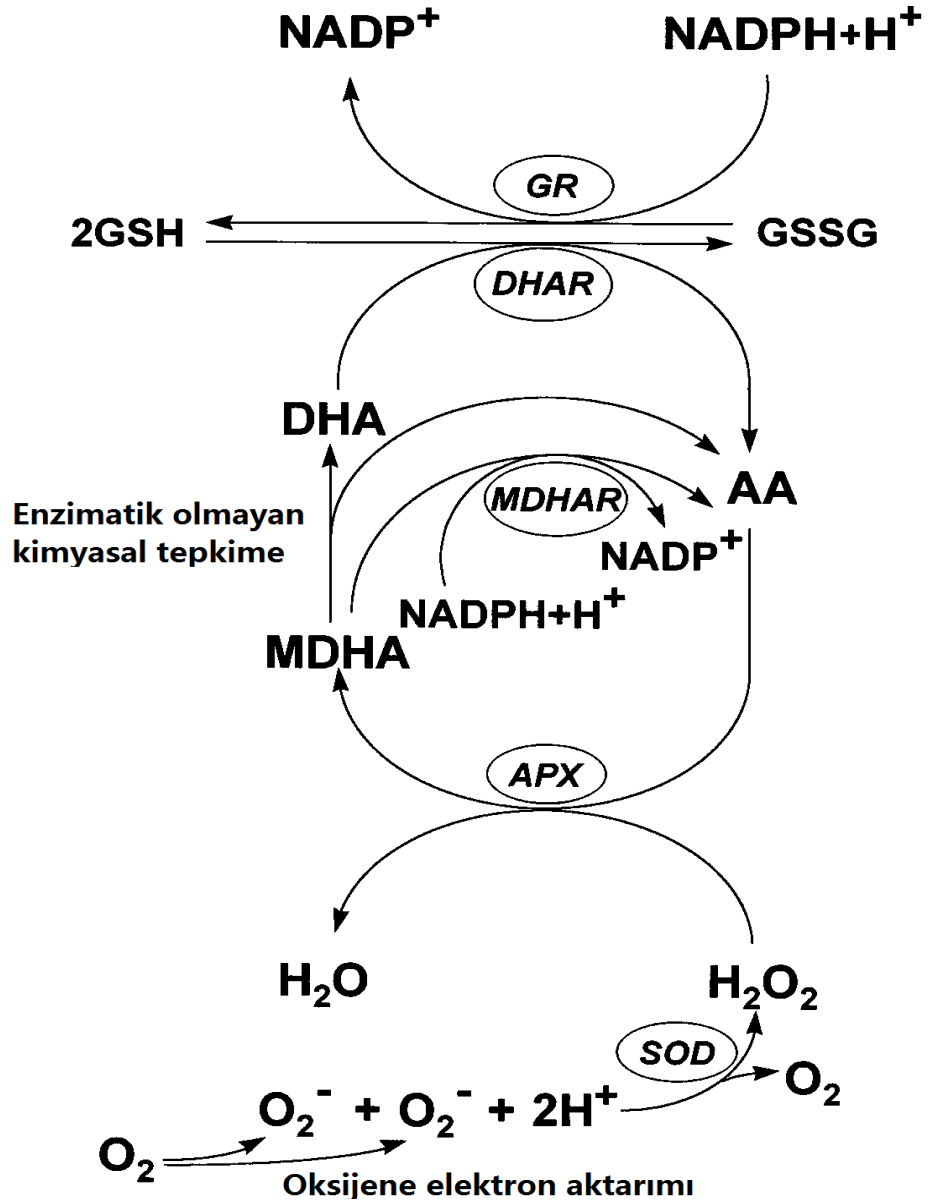
olarak süperoksit, singlet oksijen, hidroksil radikalleri ile reaksiyona girer. Bunun sonucunda da serbest radikallerin direkt temizleyicisi olarak görev yapar (Foyer *et al.* 1994; Creissen *et al.* 1996; Güler 2008). Bunların yanında glutasyon savunma genlerinin ekspresyonunu etkiler (Dron *et al.* 1988; Wingate *et al.* 1988). Hücre bölünmesinin redoks kontrolünün içinde yer alır (Sanchez-Fernandez *et al.* 1997; Shaul *et al.* 1996).

2.4.2. Askorbat (L-Askorbik Asit, C Vitamini)

Bitkilerin tümünde askorbat sentezlenebilir (Burns 1957). Fotosentetik ve fotosentetik olmayan tüm bitki dokularında askorbat milimolar konsantrasyonlarında biriktirilebilir (Foyer *et al.* 1995). Askorbik asidin bir çok fonksiyonu vardır. Bunlardan ilki hidroksil, süperoksit ve singlet oksijen radikallerine direkt olarak etki eden önemli bir primer antioksidan maddedir (Nijs and Kelley 1991; Buettner and Jurkiewicz 1996). Fotosentezin basamaklarının dengede tutulması ve ışık hasarını önlemede etkilidir (Forti and Elli 1995, Foyer and Harbinson 1994). Ayrıca prostetik grup olarak metal iyonu içeren enzimlerin aktivitelerinin korunmasında önemli rol oynar. Bunlara ilave olarak askorbat, önemli bir antioksidan olan α -tokofenollerin okside formlarını indirgeyen güçlü bir sekonder antioksidan olarak görev yapar (Padh 1990).

Bitkilerde H_2O_2 'nin detoksifikasyonu için en önemli substrat askorbattır (Mehlhorn *et al.* 1996; Nakano and Asada 1987). Askorbat-glutasyon döngüsü olarak bilinen reaksiyonlarda H_2O_2 enzimatik ve enzimatik olmayan bir seri reaksiyonla suya dönüştürülür. Bu döngüde $NADPH^+$ 'dan kaynaklanan elektronları kullanarak H_2O_2 'nin suya dönüşmesinde dört enzim rol oynar. Bu döngüde enzimlerin substratları olan glutasyon ve askorbat tükenmez (Noctor and Foyer 1998). Askorbat-glutasyon döngüsünde H_2O_2 'yi suya indirgemek için APX iki molekül askorbat kullanır. Sonuç olarak iki molekül kısa ömürlü bir radikal olan monodehidroaskorbat (MDHA) oluşur. MDHA askorbata direkt olarak indirgenebilir. MDHA'nın indirgenmesi için elektronlarını sitokrom b'ye (Horemans 1997), indirgenmiş ferrodoksin (Miyake and Asada 1992) veya $NADPH$ 'a verebilir. Reaksiyon monodehidroaskorbat redüktaz

(MDHAR) tarafından katalizlenir (Asada1997). MDHA'nın enzimatik olarak indirgenmesinin aksine enzimatik olmayan bir tepkime ile dehidroaskorbata (DHA) dönüşebilir. DHA'nın askorbata dönüşümünü ise indirgeyici substrat olarak GSH'ı kullanan dehidroaskorbat redüktaz (DHAR) katalizler (Foyer and Halliwell 1976). Reaksiyon sonucu yükseltgenmiş glutatyon (GSSG) oluşur. Glutatyon redüktaz (GR) enzimi ise NADPH tarafından GSSG'nin GSH'a indirgenmesini katalizler (Noctor and Foyer 1998) (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Askorbat-glutatyon çemberinde görevli enzimler

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Yararlanılan Alet ve Cihazlar

Buzdolabı	: Arçelik
Derin dondurucu (-30°C)	: Arçelik
Derin dondurucu (-80°C)	: Harris, İngiltere
Elektroforez	: Owl Separation Systems P10DS
Hassas terazi	: Shimadzu AY220
Homojenizatör	: Wiggen Hauser D- 500
İklim dolabı	: Sanyo, Japonya ve Jeno Tech, Kore
Karıştırıcı	: Fisons Whirlmixer
Manyetik karıştırıcı	: Chiltern HS31
Masa santrifüjü	: Hettich EBA 21
Oksijen tüketim cihazı	: Vernier Labpro
Otomatik pipetler	: Ependhof, Axigen
pH metre	: WTW unilab pH metre
Soğuk su banyosu	: Huber Polystat CC1
Soğutmalı santrifüj	: Hettich Micro 22 R
Spektrofotometre	: Shimadzu UVmini-1240
Western blot cihazı	: Bio-Rad Semi Dry Blotting
Western blot görüntileme cihazı	: Fusion Fx Vilber Lourmat

3.2. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanmaları

Çalışmada kullanılan çözeltilerin kullanıldığı yerler ve hazırlanış şekilleri aşağıda belirtilmiştir. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler Sigma ve Fluka şirketlerinden temin edilmiştir.

1. Arnon ve Hogland besi çözeltisi: 1.02 g KNO_3 , 0.492 g $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.23 g $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, 0.49 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2.86 g H_3BO_3 , 1.81 g $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.08 mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.22 mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.6 mg FeSO_4 , 0.6 mg tartarik asit saf su içerisinde çözülerek hacmi 1 litreye tamamlanmıştır.
2. 10 mM KCN stok çözeltisi : 0.1625 g KCN tartılıp 250 ml saf suda çözülmüştür. Daha düşük konsantrasyonlar hazırlanırken stok çözeltilerden seyreltilerek kullanılmıştır.
3. 10 μM AA (antimisin A) stok çözeltisi: 0.00274 g antimisin A tartılıp 750 ml saf suda çözüldü. Antimisin A'nın düşük konsantrasyonları 10 μM AA stok çözeltisinden seyreltilerek hazırlandı.
4. 10 mM NaN_3 (sodyum azid) stok çözeltisi: 0.1625 g NaN_3 tartılıp 250 ml saf suda çözüldü. Seyreltilerek düşük konsantrasyonları hazırlandı.
5. 10 mM SHAM (salisilhidroksamik asit) stok çözeltisi : 0.38285 g SHAM tartılıp 500 μl metanolde çözüldükten sonra 250 ml saf suya tamamlanıp tamamen çözünmeye bırakılmıştır. 10 mM SHAM çözeltisini seyreltme yoluyla daha düşük konsantrasyonları hazırlanmıştır.
6. 20 mM sodyum piruvat sok çözeltisi : 0.55g sodyum piruvat tartılıp 250 ml saf suda çözülür. 20 mM sodyum piruvat stok çözeltisi seyreltilerek diğer konsantrasyonlar hazırlanır.
7. 0.05 M KH_2PO_4 (pH: 6.5) (Protein tayini için) : 1.7 g KH_2PO_4 200 ml saf suda çözülmüş, 1 N NaOH kullanılarak pH 6.5'e ayarlandıktan sonra hacim saf su ile 250 ml'ye tamamlanmıştır.
8. Coomassie reaktifi (protein tayini için) : 10 mg Coomassie Blue G-250, 5 ml etanolde çözülür, üzerine 10 ml %85'lik fosforik asit ilave edilir ve hacim saf suyla 100 ml 'ye tamamlanır.

- 9.** 0.1M KH_2PO_4 (pH: 7.0), %1 PVP, 1mM EDTA (antioksidan enzimlerin homojenizasyon tamponu): 3.4 g KH_2PO_4 200 ml saf suda çözülmüş, 1 N NaOH kullanılarak pH 7.0'ye ayarlandıktan sonra hacim saf su ile 250 ml'ye tamamlanmış ve üzerine 2.5 g PVP ve 0.073 g EDTA ilave edilmiştir.
- 10.** 103.5 mM KH_2PO_4 , pH: 7.5 (Katalaz aktivitesi ölçümünde kullanılan tampon): 1.41 g KH_2PO_4 , 70 ml saf suda çözülmüş, 1 N NaOH ile pH: 7.5'e ayarlanmış ve hacim saf su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır.
- 11.** 40 mM H_2O_2 çözeltisi (Katalaz aktivitesi ölçümünde kullanılan substrat çözeltisi): 346 μl %35'lik H_2O_2 alınıp hacmi saf su ile 100ml'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.
- 12.** 5 mM H_2O_2 çözeltisi (Katalaz aktivitesi ölçümünde standart grafik hazırlamak için kullanılan): 43 μl %35'luk H_2O_2 alınıp hacmi saf su ile 100ml'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.
- 13.** 0.1 M Na_2HPO_4 , pH: 5.5 (Peroksidazın aktivitesi ölçümünde kullanılan tampon çözeltisi): 3.55 g Na_2HPO_4 alınarak 200 ml saf suda çözülmüş ve pH: 5.5'e ayarlandıktan sonra hacim saf su ile 250 ml'ye tamamlanmıştır.
- 14.** Peroksidaz aktivitesi ölçümünde kullanılan substrat çözeltisi (5mM guaikol + 5mM H_2O_2): 54 μl quaikol ve 15 μl H_2O_2 'dan ($d=1.13$ g/mol) 5 mM olacak şekilde 100 ml 0.1 M fosfat tamponu (pH: 5.5) içinde çözümlenerek hazırlanmıştır.
- 15.** 50 mM KH_2PO_4 (pH: 7.8) (SOD için tampon çözeltisi): 1.7 g KH_2PO_4 200 ml saf suda çözülmüş, pH: 7.8'e ayarlandıktan sonra ve hacim saf su ile 250 ml'ye tamamlanmıştır.
- 16.** 13 mM metionin çözeltisi (SOD reaksiyon karışımı için): 0.586 g metionin alınır, 27. maddede hazırlanmış olan 250 ml 50mM KH_2PO_4 tamponu içerisine ilave edilerek çözülür.
- 17.** 63 μM NBT-Nitroblue Tetrazolium Klorür (SOD reaksiyon karışımı için): 0.0128 g NBT alınır, 27. maddede hazırlanmış olan 250 ml 50mM KH_2PO_4 tamponu içerisine ilave edilerek çözülür.
- 18.** 0.1 mM EDTA-Etilen Diamin Tetra Asetik asit (SOD reaksiyon karışımı için): 0.073 g EDTA alınır, 27. maddede hazırlanmış olan 250ml 50mM KH_2PO_4 tamponu içerisine ilave edilerek çözülür.

19. 13 μ M riboflavin (SOD aktivitesi için 2. çözelti): 0.019 g riboflavin, 500 ml saf suda çözülmüş, 3 ml'lik reaksiyon karışımının 13 μ M riboflavin içermesi için 390 μ L riboflavin alınmıştır.
20. %5 lik TCA - trikloroasetik asit (Lipid peroksidasyon için homojenizasyon çözeltisi) : 100 ml saf su içerisine 5 g TCA ilave edilerek çözülür.
21. %0.5 lik TBA-tiobarbutirik asit (Lipid peroksidasyon için reaksiyon çözeltisi): 100 ml saf su içine 20 gram TCA çözülür ve daha sonra içerisine %0.5 TBA ilave edilerek iyice çözünmesi sağlanır.
22. Monomer(akrilamid/bis) çözeltisi (%30 akrilamid, %2.7 bis) : 29.2 akrilamid 75 ml saf suda çözülür, çözeltiye 0.8 g bis katılıp çözülür. Son hacim 100 ml'ye tamamlanır.
23. Ayırma jeli tamponu (1.5 M Tris, pH : 8.8) : 18.15g tris 50 ml saf suda çözülür. HCl ile pH 8.8' e ayarlanır. Saf su ile 100 ml' ye tamamlanır.
24. Yükleme jeli tamponu (0.5 M Tris, pH : p.8) : 3 g tris 40 ml saf suda çözülür. HCl ile pH 6.8' e ayarlanır. Saf su ile 50 ml'ye tamamlanır.
25. %10 SDS : 1g SDS son hacim 10 ml olacak şekilde saf suda çözülür.
26. %10 Amonyum persülfat (polimerizasyon başlatıcı) : 0.05 g amonyum persülfat son hacim 500 μ l olacak şekilde saf suda çözülür.
27. Örnek uygulama tamponu (0.125 M Tris, %4 SDS, %20 gliserol, %10 2-merkaptotanol, %0,2 bromfenol mavisi pH: 6.8): 2.5 ml yükleme jeli tamponu, 4 ml %10 SDS, 2 ml gliserol, 1 ml 2-merkaptotanol alınıp son hacim 10 ml olacak şekilde saf su ile tamamlanır, pH: 6.8'e ayarlanır. Karışıma 0.02 g bromfenol mavisi katılarak karıştırılır. Kullanılacak hacimlere bölünüp -20°C'de saklanır.
28. Tank tamponu (0.025M Tris, 0.192 M glisin, %0.1 SDS, pH: 6.8) : 3g Tris, 14.4 g Glisin, 1g SDS alınır. 900 ml saf suda çözülerek pH 6.8'e ayarlanır. Son hacim 1000ml'ye saf su ile tamamlanır.
29. Boyama substrat çözeltisi (SOD izoenzimleri için) (0.24 mM NBT, 33.2 μ M riboflavin, %0.2 TEMED, 1 mM EDTA, 0.05 M KH_2PO_4 pH 7.8): 0.0098g NBT, 100 μ l TEMED, 0.147g EDTA, 0.345 g KH_2PO_4 40 ml saf suda çözülüp pH: 7.8'e ayarlanır. 1 ml saf su içerisinde 0.0062 g riboflavin çözülür ve 100 μ l'si boyama substrat çözeltisine katılır. Çözeltinin son hacmi 50 ml'ye saf su ile katılır.

- 30.** 1 mM EDTA, 0.05 M KH_2PO_4 pH 7.8(SOD izoenzimleri için): 0.147 g EDTA, 0.345 g KH_2PO_4 40 ml saf suda çözülüp pH 7.8'e ayarlandıktan sonra son hacim 50 ml olacak şekilde saf su ile tamamlanır.
- 31.** 2 mM askorbik asit, 50 mM Na_2HPO_4 (APX izoenzimleri için): 0.0352 g askorbik asit, 1.34 g Na_2HPO_4 80 ml saf suda çözülür ve pH 7.0'a ayarlanır. Son hacim 100 ml olacak şekilde saf su ile tamamlanır.
- 32.** 4 mM askorbik asit, 2 mM H_2O_2 , : 50 mM Na_2HPO_4 (APX izoenzimleri için): 2mM askorbik asit çözeltisinden 50 ml alınır üzerine 0.0176 g askorbik asit ve 10 μl %35 H_2O_2 katılıp iyice karıştırılır.
- 33.** 28 mM TEMED, 2.4 mM NBT, içeren 50 mM Na_2HPO_4 (pH 7.8) tamponu (APX izoenzimleri için) : 105 μl TEMED, 0.0491 g NBT, 0.335 g Na_2HPO_4 20 ml saf suda çözülerek pH 7.8' e ayarlandıktan sonra son hacim 25 ml'ye saf su ile tamamlanır.
- 34.** 0.4 M mannitol, 50 mM MOPS, 2mM EGTA, 4 mM L-sistein, %0.6 PVP, 20 mM β -merkaptotanol, %0.5 BSA (Mitokondri izolasyonu için homojenat tamponu): 3.64 g mannitol, 0.5225 g MOPS 40 ml saf suda çözülüp pH: 7.2'ye ayarlandıktan sonra 0.0388 g EGTA, 0.0242 g L-sistein, 0.3 g PVP, 0.25 g BSA ve 70 μl β -merkaptotanol, aynı çözeltide çözüldükten sonra son hacim 50 ml'ye ayarlanır.
- 35.** 0.3 M mannitol, 20 mM MOPS, 1 mM EGTA, %0.1 BSA (Mitokondri yıkama tamponu): 2.73 g mannitol, 0.209 g MOPS 40 ml saf suda çözülüp pH: 7.2'ye ayarlandıktan sonra 0.0194 g EGTA ve 0.05 g BSA aynı çözeltide çözülür. Son Hacim 50 ml olacak şekilde saf su ile tamamlanır.

3.3. Yöntemler

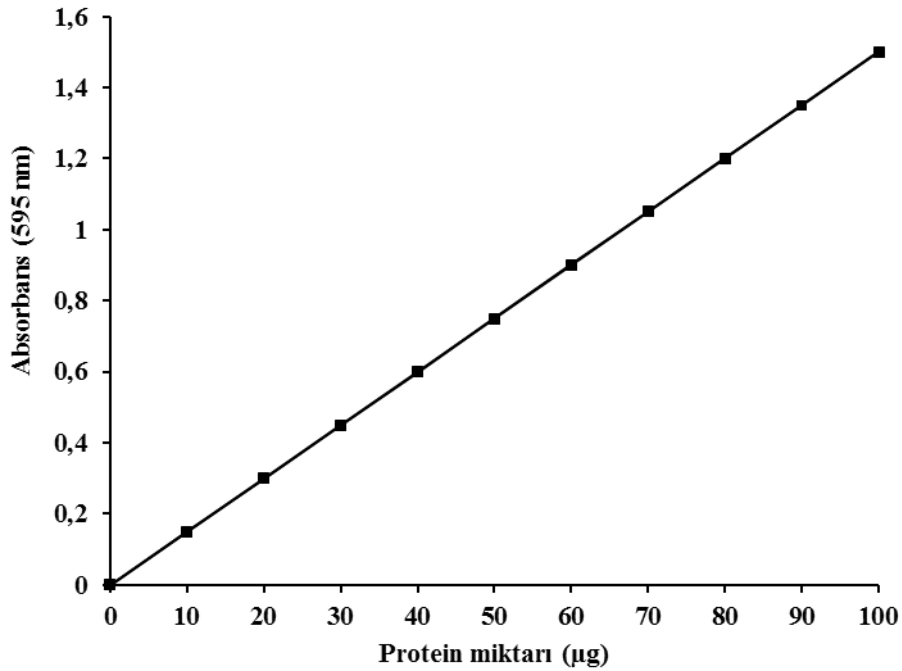
3.3.1. Bitkilerin büyütülmesi

Yapılan çalışmalarda soğuğa tolerans yetenekleri farklı olan buğday (*Triticum aestivum* cv. Müfitbey) ve nohut (*Cicer arietinum* cv. Yaşa-05) bitkileri kullanılmıştır. Tohumlar Geçit Kuşağı Tarımsal Araştırma Enstitüsü'nden temin edilmiştir. Tohumlar ekilmeden önce %96'lık alkol ile kısa süreli hızlıca yıkanmış ve %5'lik sodyum hipoklorit içerisinde 5 dk yüzey sterilizasyonuna tabi tutulmuştur. Daha sonra 3 kez saf su ile yıkanarak, oda şartlarında saf su içerisinde yaklaşık 5 saat şişmeye bırakılmıştır. Her saksıya saf su ile şişirilmiş tohumlar eşit miktarda ekilmiştir. Bitkiler iklim dolabında kontrol şartlarında (25/20°C sıcaklık ve 14/10 saat ışık-karanlık periyodunda 20.000 lüks, %70 nem) büyütülmüştür. Her saksı, kesileceği güne kadar, günlük eşit miktarda saf su ve haftada bir kez de Hoagland besi çözeltisiyle sulanmıştır. Nohut bitkilerine dokuzuncu günlerinde, buğday gruplarına ise on üçüncü gün değişik konsantrasyonlarda solunum inhibitörlerinden; azid ve antimisin A, alternatif solunum yolu aktivatörü; piruvat ve alternatif solunum yolu inhibitörü salisilhidroksamik asit (SHAM) uygulamaları yapılmıştır. Uygulamalar çözeltilerin yapraklara püskürtülmesi suretiyle gerçekleştirilmiştir. Bu maddelerin uygulanmasından 12 saat sonra bitki grupları iklim dolabına aktarılmıştır. İklim dolabı buğday bitkisi için 5/2°C, nohut için ise 10/5°C sıcaklık değerlerine ayarlanmıştır. Bitkiler iklim dolabına aktarılmalarından 48 saat sonra hasat edilerek moleküler ve biyokimyasal parametrelerindeki değişimler belirlenmeye çalışılmıştır.

3.3.2. Çözünabilir protein miktarının tayini

Bitkilerin kök ve yapraklardan ayrı ayrı alınan 0.5g'lık örnekler kullanılarak Bradford (1976) metoduna göre protein tayini yapılır. Sonuçlar "mg protein/g taze doku cinsinden hesap edilir. Her bir muameleye ait bitkilerin, küçük parçalara ayrılmış organlarından (kök, gövde ve yaprak) 0.5g alınarak 10 misli hacimdeki 0.05 M fosfat

tamponunda (pH:6.5) havanda ezilerek homojenizasyon yapılır. Homojenat dört katlı tülbentten süzülür ve süzüntü santrifüj tüplerine alınıp, 15.000 rpm' de 20dk. boyunca santrifüj edilir. Protein tayini için tüplerin üst kısmındaki sıvı faz (süpernatant) kullanılır. Protein miktarı spektrofotometrik yolla tayin edilir. Metot için gerekli standart grafik şu şekilde hazırlanır; 1ml'sinde 1 mg protein içeren standart sığır albumin çözeltisinden 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 µg protein içeren hacimler tüplere aktarılıp, saf su ile bütün tüplerin hacimleri 0.2ml'ye tamamlanır. Bu tüplere 3'er ml de Coomassie reaktifi ilave edilip vorteks ile karıştırılır. Kör numune olarak 0.2 ml aynı tampondan ve 3 ml Coomassie reaktifinden oluşan karışım kullanılır. Yapılan spektrofotometrik ölçümler sonucunda, 595 nm'deki absorbanans değerlerine karşılık gelen protein değerlerinden yararlanarak standart grafik elde edilir. Standart grafik hazırlama çalışmasında olduğu gibi, bitki organlarından elde edilen özütlerden 0.2 ml alınıp, 3 ml Coomassie reaktifiyle karıştırılır ve 595 nm'de absorbanansları ölçülerek, standart grafikten yararlanılıp, 0.2 ml özütdeki protein miktarları belirlenir. Daha sonra, gerekli hesaplamalar yapılarak protein miktarları µg protein/g doku olarak tayin edilir.



Şekil 3.1. Protein tayini için kullanılan standart grafik

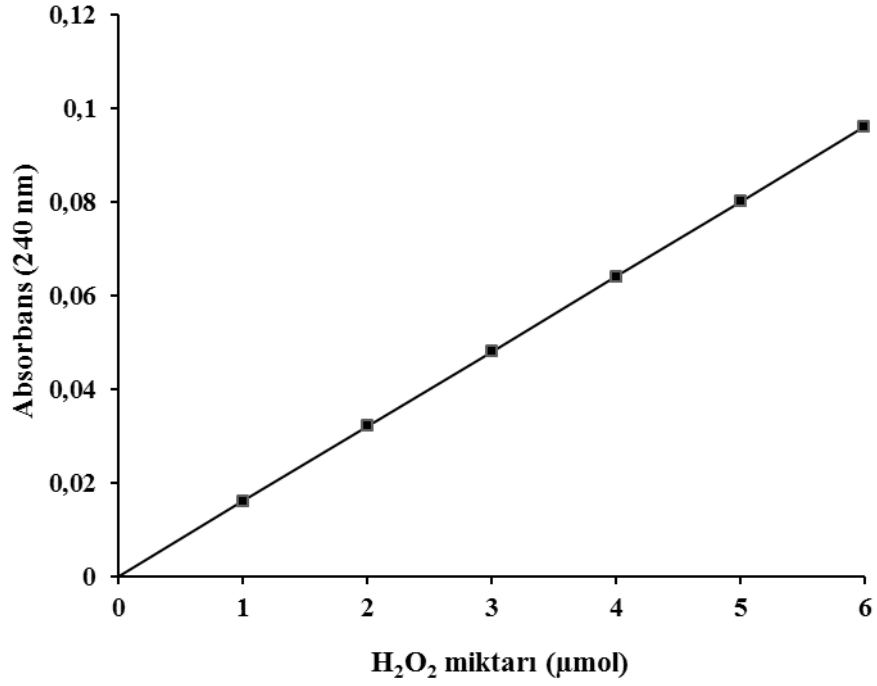
3.3.3. Antioksidan enzim aktivitelerinin belirlenmesi

0.5'er gram kök ve yaprak örnekleri 5 ml 0.1 M fosfat tamponunda homojenize edilerek 15000 rpm'de 15 dk santrifüj edilir. Süpernatant kısmı alınarak enzim kaynağı olarak kullanılır.

3.3.3.a. Katalaz (CAT) aktivitesinin belirlenmesi

Katalazın (CAT) aktivite tayini için Gong *et al.* (2001) uyguladığı metot kullanılır. Bu metot, katalazın ortamdaki H₂O₂'nin oksijen ve suya dönüşümünü sağlarken meydana gelen absorbans değişiminin 240 nm'de izlenmesi esasına dayanır.

Önce reaksiyonda azalan H₂O₂ miktarını belirlemek için standart grafik hazırlanır. Standart grafik hazırlamak için, 5 mM H₂O₂ çözeltisinden 3 ml'lik spektrofotometre tüplerine sırasıyla; 0.15, 0.3, 0.45, 0.6, 0.75, 0.9, 1.05, 1.2, 1.35 ve 1.5 ml konular, tüplerin hacimleri saf su ile 1.5 ml'ye tamamlanır ve her tüpe 1.47 ml 103.5 mM KH₂PO₄ ve 30 µl su ilave edilir. Spektrofotometrede 240 nm'de absorbans köre karşı okunur ve absorbans değerlerine karşılık gelen µM H₂O₂ değerleri kullanarak standart grafik elde edilir. Aktivite ölçümü için 3 ml'lik spektrofotometre küvetine, 103 mM KH₂PO₄ tamponundan 1.475 ml ve 40 mM'lık H₂O₂ substrat çözeltisinden 1.5 ml konulduktan sonra, 25 µl enzim ekstraktı ilave edilir. Spektrofotometrede 240 nm'de 3 dakika boyunca 1 dakika aralıklarla köre karşı absorbansı okunur ve absorbansın doğrusal olarak azaldığı aralıktan dakika başına absorbans azalması hesaplanır. Bu ortalama absorbans değerleri, standart grafik yardımıyla µmol cinsinden H₂O₂ miktarına dönüştürülür. 25°C'de, 1 dakika içinde, absorbansı 1 µmol azaltan enzim miktarı 1 enzim ünitesi olarak kabul edilir ve sonuçlar g yaprak başına düşen enzim ünitesi (U.mg⁻¹ protein) olarak sunulur.



Şekil 3.2. Katalaz aktivitesi ölçümünde kullanılan standart grafik

3.3.3.b. Peroksidaz aktivitesinin belirlenmesi

Peroksidaz (POD) aktivite tayini, guaikol ve H₂O₂'nin substrat olduğu reaksiyonun ürünü olan renkli bileşiğin meydana getirdiği absorbans artışının 470 nm'de izlenmesi esasına dayanmaktadır.

Aktivite ölçümü için spektrofotometre küvetine; 100 ml 0.1 M, NaH₂PO₄ (pH: 5.5) ve 5 mM guaikol ve 5mM H₂O₂ içeren substrat çözeltisinden 3 ml konulduktan sonra, üzerine 10 µl enzim ekstraktı ilave edilir. 470 nm'de 5 dakika boyunca absorbans artışı 1 dakika aralıklarla kaydedilir ve absorbansın doğrusal olarak arttığı kısımdaki absorbans artışı 1 dakikaya oranlanır. 25°C'de 1 dakikada, absorbansı 0.01 artıran enzim miktarı 1 enzim ünitesi olarak kabul edilir ve sonuçlar g yaprak başına düşen enzim ünitesi (U.mg⁻¹ protein) olarak sunulur (Yee *et al.* 2002; Erdal 2010).

3.3.3.c. Süperoksit dismutaz aktivitesinin belirlenmesi

Süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi, nitro blue tetrazoliumun (NBT) süperoksit radikalleri ile mavi renkli formazona fotokimyasal indirgenmesi reaksiyonunun SOD enzimi tarafından engellenmesinin spektrofotometrik olarak belirleme esasına dayanır (Mutlu 2009).

Reaksiyon karışımı (3 ml); 50 mM KH_2PO_4 (pH: 7.8), 13 mM metiyonin, 63 μM NBT, 13 μM riboflavin ve 0.1 mM EDTA içermektedir. Aktivite ölçümü için 3 ml spektrofotometre küvetine yukarıdaki riboflavin içermeyen reaksiyon karışımından 2,58 ml alınmış ve üzerine 30 μL enzim ekstraktı pipetlenmiştir. Reaksiyon, tüp üzerine 13 μM 'lık riboflavin çözeltisinden 390 μL pipetlenip karıştırıldıktan hemen sonra, beyaz bir ışık kaynağı önüne yerleştirmek suretiyle başlatılmıştır. Tüp, ışık kaynağının karşısında 15 dk. tutulmuş ve reaksiyon ışık kaynağının kapatılmasıyla durdurulmuştur. 15 dk. içerisinde NBT'nin renk açılma yoğunluğu 560 nm'de köre karşı okunmuştur. Kör; aynı işlemin enzimsiz örneğinden oluşmaktadır. SOD aktivitesinin 1 ünitesi, 560 nm'de gözlenen NBT indirgenmesinin %50 inhibisyonuna neden olan enzim miktarı, 1 enzim ünitesi olarak kabul edilmiş ve değerler U.mg^{-1} protein olarak sunulmuştur (Agarwal and Pandey 2004; Yordanova *et al.* 2004).

3.3.3.d. Askorbat peroksidaz (APX) aktivitesinin tayini

Askorbat peroksidaz aktivitesi, 290 nm'de absorbandsdaki azalışa bağlı olarak belirlenir (Nakano ve Asada; 1981). Enzim aktivitesi, 50 mM Potasyum fosfat tamponu (pH 7,0), 250 μM askorbik asid (ASC), 5 mM H_2O_2 ve 20 μl enzim ekstraktı içeren 1 ml'lik reaksiyon karışımının ölçülmesiyle belirlenir. Askorbat peroksidaz aktivitesi, 290 nm'de ASC için $2,8 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ epsilon katsayısının kullanılmasıyla hesaplanır. Sonuçlar U.mg^{-1} protein olarak ifade edilir.

3.3.3.e. Glutasyon redüktaz (GR) aktivitesinin tayini

Glutasyon redüktaz aktivitesi spektrofotometrik olarak Foyer ve Halliwell (1976)'e göre belirlenir. Substrat olarak 0,25 mM NADPH ve 1 mM oksitlenmiş glutasyon (GSSG) kullanılır. Yükseltgenmiş glutasyonun enzim tarafından indirgenmesi için indirgeyici faktör olarak NADPH kullanılır. Aktivite tayini için, 200 µl 0,5 mM EDTA içerisinde hazırlanmış 50 mM Tris-HCl (pH 7,8), 250 µl GSSG ve 500 µl NADPH ihtiva eden karışıma 50 µl enzim ekstraktı ilave edilir. NADPH'ın oksidasyonu 340 nm'de 5 dakika boyunca azalmanın ölçülmesiyle belirlenir. GR aktivitesi $U \cdot mg^{-1}$ protein olarak ifade edilir.

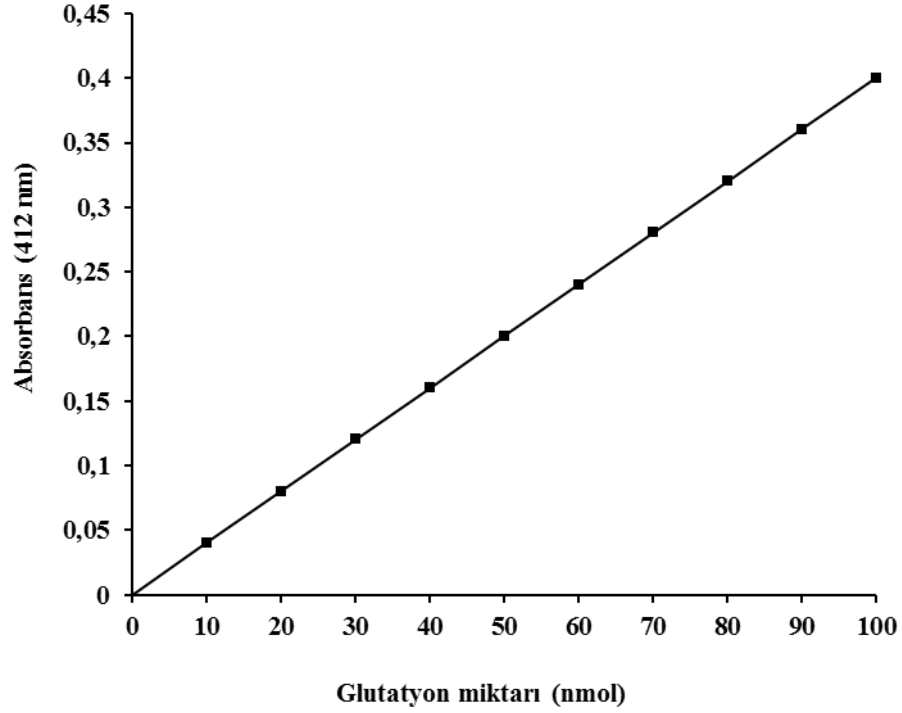
3.3.4. Antioksidan maddelerin içeriklerinin belirlenmesi

3.3.4.a. Glutasyon ekstraksiyonu

Yapraktan alınan 0,5 g dokular sıvı azot içerisinde toz haline getirildi. Daha sonra 5 ml, 1 mM EDTA içeren %5'lik metafosforik asit içerisinde homojenize edildi. Ekstrakt 4°C'de 10 000xg'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant glutasyon içeriğinin belirlenmesinde kullanıldı.

3.3.4.b. Glutasyon (GSH) içeriğinin belirlenmesi

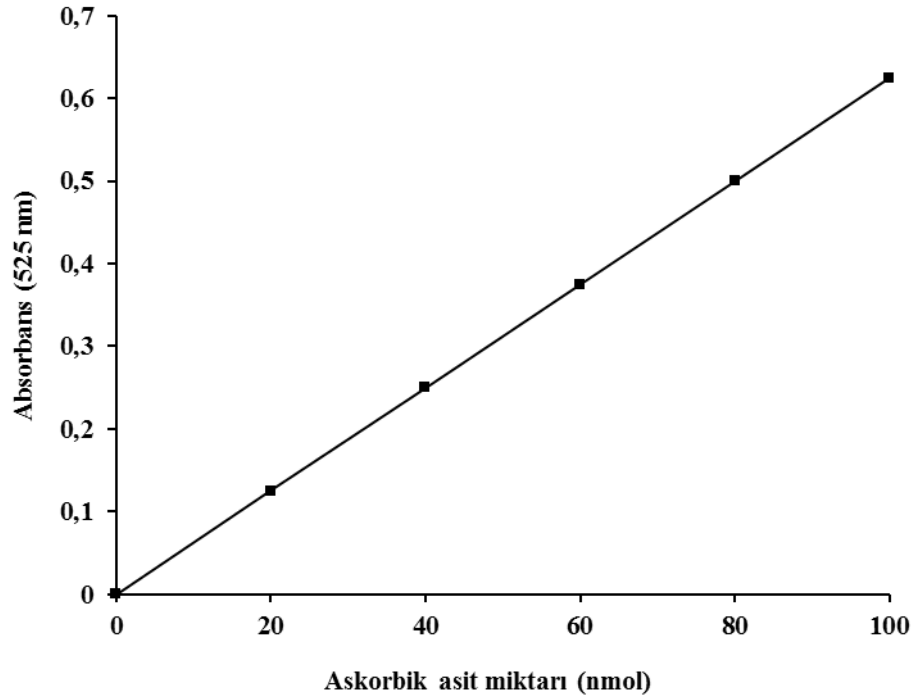
Glutasyon içeriği spektrofotometrik olarak Griffith (1980) yöntemine göre belirlenir. Glutasyon (GSH+GSSG) 250 mM K_2HPO_4/KH_2PO_4 (pH 7,5), 200 µM NADPH, 600 µM DTNB, 25 µl ekstrakt ve 0,3 U GR içeren reaksiyon karışımının kullanılmasıyla ölçülür. 412 nm'de absorbanstaki değişim 3 dakika boyunca ölçülür. GSSG içeriğini belirlemek için 25 µl ekstrakt 2-vinylpyridine ile 25°C'de 1,5 saat boyunca inkübe edilir. Glutasyon konsantrasyonu 0-100 nmol konsantrasyonlarda GSH'ın kullanılmasıyla elde edilen standart grafik üzerinden hesaplanır.



Şekil 3.3. Glutasyon içeriğini belirlemede kullanılan standart grafik

3.3.4.c. Askorbik asit (ASC) içeriğinin belirlenmesi

Askorbik asit içeriği Hodges *et al.* 1996 metodunun Wu *et al.* 2009 tarafından modifiye edilmiş hali ile belirlendi. Bu metoda göre 250 mg yaprak dokusu 2.5 ml %5 TCA içerisinde homojenize edilir. Homojenat 12 000g de 10 dakika santifirüj edilir. Süpernatantın 200 µl alınarak üzerine 800 µl 50 mM KH₂PO₄ (pH: 7.4), 3 mM EDTA, 1 mM DTT içeren karışımdan eklenir. Karışım vorteklendikten sonra 25°C'de 10 dakika inkübe edilir. Daha sonra karışım üzerine sırasıyla 100 µl N-ethylmaleimide, 400 µl 0.61 M TCA, 400 µl ortofosforik asit ve 400 µl α-bipyridyl eklenerek karıştırılır. Yeni karışım üzerine 200 µl FeCl₃ eklenerek vortekslenir ve 1 saat süreyle 40°C su banyosunda bekletildikten sonra 525 nm de absorbans değerleri belirlenir. Askorbik asitin konsantrasyonu standart grafikten gram dokudaki nmol cinsinden hesaplanır.



Şekil 3.4. Askorbik asit içeriğini belirlemede kullanılan standart grafik

3.3.5. Lipid peroksidasyon miktarının belirlenmesi

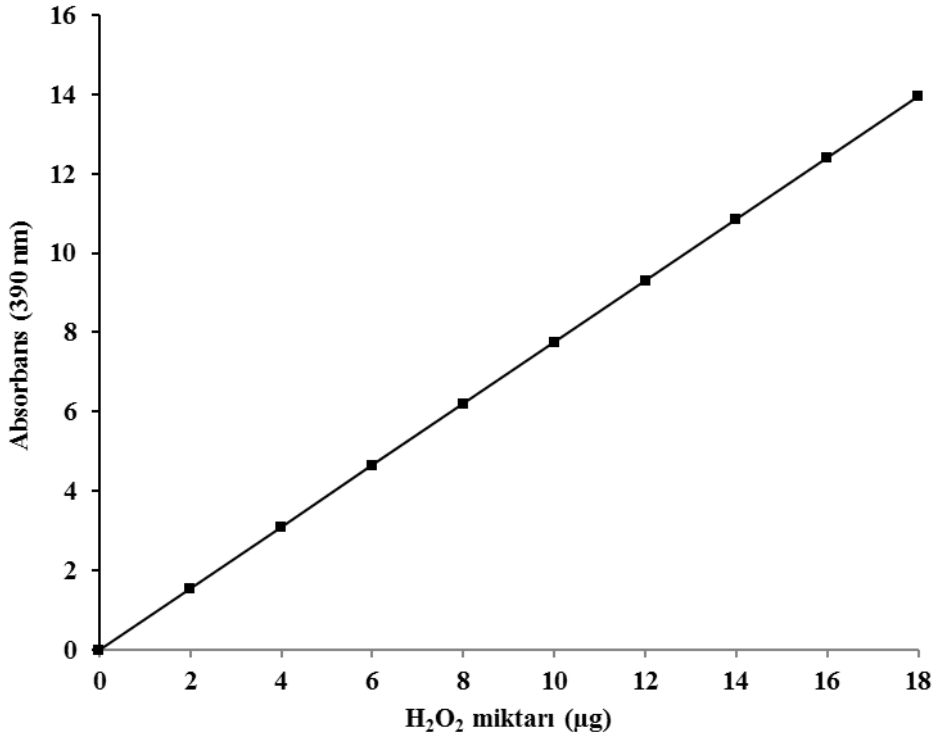
Lipid peroksidasyonu için 0.5 g yaprak alınarak 10 ml %0.1'lik TCA (trikloro asetik asit) içinde homojenize edildikten sonra homojenat 15.000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Tüpün süpernatant kısmından 1 ml alınarak üzerine 250 µl %0.5'lik TBA çözeltisi ilave edilmiştir. Reaksiyon karışımı kaynar suda 30 dakika inkübe edilmiş ve reaksiyon tüplerin buz banyosuna alınmasıyla durdurulmuştur. Örnekler 10000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek süpernatant kısmı alınmış ve 532 nm absorbans değeri ve 600 nm deki non-spesifik absorpsiyon için absorbans değeri okunmuştur.

Lipid peroksidasyonun hesaplanması için; 532 nm'de ölçülen absorbans değerinden 600 nm'de belirlenen değeri çıkarılmış ve 1 ml çözeltideki MDA (nmol/µl): $[(A_{532} - A_{600})/155000] \times 10^6$ formülüyle hesaplanmıştır. Sonuçlar MDA (nmol.g⁻¹ doku) şeklinde verilmiştir (Jaleel *et al.* 2007; Heath and Packer 1968; Erdal 2010).

3.3.6. Hidrojen peroksit (H₂O₂) miktarının belirlenmesi

0.5 gram bitki dokusu alınarak 5 ml soğuk %0,1 TCA homojenize edildikten sonra homojenat 12 000 x g'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Daha sonra elde edilen süpernatantın 0.5 ml'sine 0.5 ml 10 mM KH₂PO₄ (pH: 7.0) tamponundan ve 1ml KI eklendi. Absorban değerleri 390 nm'de ölçülüp kaydedilmiştir. Sonuçlar standart grafikte oranlanarak g doku başına düşen H₂O₂ miktarı (µg.g⁻¹ doku) olarak hesaplanmıştır (Velikova *et. al.* 2000).

Standart grafiğin hazırlamak için, H₂O₂ çözeltisinden eppendorf tüplerine sırasıyla; 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 ve 18 mikrogram H₂O₂ olacak şekilde hesaplanarak konuldu. Tüpün hacmi 1 ml olacak şekilde 10 mM KH₂PO₄ (pH: 7.0) tamponu ile tamamlandı. Daha sonra her tüpe 1ml KI ilave edilmiştir. Absorbans değerleri 390 nm'de köre karşı okunmuştur. Absorbans değerlerine karşılık gelen mikrogram H₂O₂ değerleri kullanarak standart grafik elde edilmiştir.



Şekil 3.5. Hidrojen peroksit (H₂O₂) miktarını belirlemede kullanılan standart grafik

3.3.7. Süperoksit ($O_2^{\cdot-}$) üretiminin belirlenmesi

Süperoksit içeriği Elstner and Heupel (1976) tarafından tanımlanan metoda göre ölçüldü. Bitki yapraklarından 0,4 g alınarak 2 ml 50 mM potasyum fosfat tamponunda (pH: 7,8) homojenize edildi. Homojenat 10 dakika 10000 g'de santifüj edildikten sonra süpernatanttan 0,5 ml alınarak üzerine 0,5 ml 50 mM potasyum fosfat (pH: 7,8) tamponundan eklendi. Daha sonra karışıma 0,1 ml 10 mM hidroksilamin hidroklorid eklenerek karıştırıldı. Karışım 1 saat 25°C' de inkibe edildikten sonra üzerine 1 ml 17 mM sülfonamid ve 1 ml 7 mM α -naftilamin eklenerek oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edildi. Daha sonra 530 nm'de spesifik absorpsiyon değerleri belirlendi. Süperoksit anyonu içeriğini hesaplamak için sodyum nitrit kullanılarak standart grafik hazırlandı. Sonuçlar $nmol \cdot min^{-1} \cdot g^{-1}$ doku olarak belirlendi.

3.3.8. SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi (SDS PAGE)

Western blot analizi için mitokondrial proteinler %4–10 kesikli sodyum dodesilsülfat poliakrilamid jel elektroforezinde (SDS-PAGE) Laemmli (1970) yöntemi ile yürütüldü. Bunun için elektroforez plakaları önce su, sonra alkol ile iyice yıkanır. İki cam plaka birbirine üstüne konular ve kısıkaçlarla tutturularak jel hazırlama cihazına konular. Ayırma jeli hazırlanarak plakalar arasına enjektörle aktarılır. Bu işlemler yapılırken hava almamasına dikkat edilir. Jel yüzeyinin düzgün olması için izopropil alkol ile ince bir tabaka oluşturulur. Polimerleşinceye kadar yaklaşık yarım saat beklenir. Polimerizasyon bittikten sonra üzerindeki izopropil alkol dökülür. Daha sonra yığılma jel üst yüzeye kadar ilave edilir. Yaklaşık 45 dakika sonra tarak dikkatlice çıkarılarak plakalar elektroforez tankına yerleştirilir. Oluşan boşluklar işaretlenerek jelin üstü önce saf su, sonra da yürütme tamponu ile yıkanır. Elektroforez tankının alt ve üst kısmına yürütme tamponu konular. Numuneler her birinde 20 μg protein olacak şekilde hazırlanır. Toplam hacim 100 μl olacak şekilde 1/1 oranında numune tamponu katılır. beş dakika boyunca kaynar su banyosunda inkübe edilir. Numuneler soğutulur, elektroforeze çok ince bir enjektör yardımıyla uygulanır. Tank kapağı kapatılarak (+) kablo (Anot) ve (-) kablo (katot) yerleştirilir. Önce 80 voltluk akım yarım saat geçirilir. Daha sonra akım

120 volta ayarlanarak 2-4 saat oda sıcaklığında tatbik edilir. Akım kesilerek, cam plakalar arasındaki jel dikkatlice çıkarılır.

Yığıma jeli hazırlanması sırasında 1 M'lık Tris-HCl (pH: 6,8)'den 380 µl, %30'luk akrilamid-%0,8'lik bisakrilamid'den 400 µl, %10'luk SDS'den 30 µl, %5'lik TEMED'den 3 µl, ve saf sudan 2,2 ml alınarak karıştırıldı. Son olarak yine günlük hazırlanmış %10'luk amonyum persülfat (NH₄)₂S₂O₈ (PER)'den 30 µl, ilave edilir.

Ayırma jeli şöyle hazırlandı: 2,03 ml 1M Tris-HCl (pH: 8,8), 2,67 ml %30'luk akrilamid, %0,8'lik bisakrilamid, 80 µl %10 SDS, 3,2 µl %5'lik TEMED (N,N,N',N'-tetrametil etilen daimin) ve 3,15 ml su karıştırılır. Bu karışımın üzerine en son olarak 80 µl % 10'luk PER ilave edilir. Burada kullanılan PER kullanılmadan hemen önce taze olarak hazırlanır.

3.3.9. Poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE) ile izoenzimlerin belirlenmesi

Poliakrilamid jeller SDS-PAGE jelleri aynı şekilde hazırlandı ancak jel ortamına SDS katılmadan hazırlandı. İzoenzimler belirlenirken antioksidan enzim aktiviteleri için kullanılan enzim ekstraktlarına %20 gliserol eklendi ve içerisinde 50-300 µg protein olacak şekilde hazırlanıp kuyucuklara yüklendi. Çalışmalarda %4 yığıma jeli çalışılan enzime göre %8, 10 ve 11 ayırma jeli kullanıldı. Yürütme tamponu (18,76 glisin ve 3,02 g Tris, 1 L, pH 8,3) kullanılarak +4°C'de, 80-120 Voltta 3-4 saat yürütüldü. Yürütme tamponuna askorbat peroksidaz için 2 mM askorbik asit ilave edildi.

3.3.9.a. Süperoksit dismutaz (SOD) izoenzimlerinin belirlenmesi

SOD izoenzimleri için %4-10 kesikli poliakrilamid jel kullanıldı. SOD izoenzimleri Beuchamp and Fridovich (1971) tarafından tanımlanan poliakrilamid jel elektroforezi ile belirlenir. Jel Elektroforezden çıkarıldıktan sonra 0,24 mM NBT, 33,2 µM riboflavin, %0,2 TEMED ve 1 mM EDTA ihtiva eden 0,05 M potasyum fosfat

tamponunda (pH 7,8) 37°C'ye ayarlı etüvde karanlıkta 30 dakika inkübe edildi. Daha sonra jel, 1 mM EDTA ihtiva eden 0,05 M potasyum fosfat tamponuna (pH 7,8) alındı ve aydınlatılmış bir ortamda izoenzimlerin görülebilmesi için 10-30 dakika bekletilir. Saf su ile yıkandıktan sonra jeldeki bantların görüntüsü kaydedildi.

3.3.9.b. Askorbat peroksidaz (APX) izoenzimlerinin belirlenmesi

Poliakrilamid jel elektroforezi ile askorbat peroksidaz izoenzimleri Lee and Lee (2000) tarafından tanımlanan yöntemle %4-11 kesikli jel ile belirlendi. Elektroforezden sonra jel dikkatli bir şekilde çıkarılıp 2 mM askorbik asit içeren sodyum fosfat tamponuna (pH 7,0) alınarak 30 dakika inkübe edildi. Daha sonra jel, 4 mM askorbik asit ve 2 mM H₂O₂ içeren aynı tampon içerisinde 20 dakika inkübe edildi. Bundan sonra, 28 mM TEMED, 2,4 mM NBT içeren 50 mM sodyum-fosfat (pH 7,8) tamponu içerisine alınarak 10-20 dakika bekletilen jel son olarak saf su ile yıkandı ve izoenzim bantları belirlendiğinde jel saf su ile yıkandı. Koyu zeminüzerinde açık renk olarak kendini belli eden APX izoenzim bantlarının görüntüsü kaydedildi.

3.3.10. Mitochondri izolasyonu

Bitki yaprakları sıvı azotta homojenize edildi. Daha sonra ağırlığının 4 katı kadar hacimde 0,4 M mannitol, 50 mM MOPS (pH 7,2), 2mM etilen glikol tetra asetik asid (EGTA), 4 mM L-sistein, %0,6 polivilprolidin (PVP), 20 mM β- merkaptotanol ve %0,5 bovine serum albumin (BSA) içeren ekstraksiyon tamponunda 4°C de homojenize edildi. Karışım 5 dakika 400 g 'de santifüj edildi. Süpernatant kısmı alınıp 15 dakika 2000 g' de santifüj edildi. Santifüj işleminden sonra süpernatant alınıp 30 dakika 10000 g' de tekrar santifüj edildi. Oluşan pelet alınıp 0,3 M mannitol, 20 mM MOPS (pH 7,2), 1mM EGTA ve %0,1 BSA içeren tamponda homojenize edildi. Elde edilen karışım 2000 g' de 10 dakika santifüj edildi. Süpernatant alınıp 15 dakika 15000 g' de santifüj edildi. Elde edilen saf mitochondri peleti az miktarda yıkama tamponunda homojenize edilip oksijen tüketimi ve Western blot analizleri için -80°C de muhafaza edildi (Plummer 1980; Chien 2011).

3.3.11. Hücresel total solunum değeri ve AOX (Alternatif oksidaz) aktivitesi

Yıkama tamponunda çözülmüş izole mitokondrilerin oksijen tüketimi, ortama ikişer dakika aralıklarla eklenen 2 mM KCN ve 4 mM SHAM'ın neden olduğu oksijen tüketimi değerlerindeki değişimler kaydedilerek belirlendi. Sitokrom yolu inhibitörü 2 mM KCN eklenene kadar olan değer hücresel solunum değerini 2 mM KCN ile alternatif oksidaz inhibitörü 4 mM SHAM arasındaki oksijen tüketim değeri ise AOX aktivitesi olarak belirlendi (Borecky and Vercesi 2005).

3.3.12. AOX ifadesi analizi (western blot)

Bitki dokularından izole edilen mitokondrial protein ekstraktları %4-10 kesikli sodyum dodesilsülfat poliakrilamid jel elektroforezinde (SDS-PAGE) Laemmli (1970) yöntemi ile molekül büyüklüğüne göre ayrımı yapılacak. Daha sonra molekül büyüklüğüne göre ayrılmış proteinler Towbinet *al.* (1979) tarafından tanımlanan metodla 13mM tris (pH: 7,2), %10 metanol ve 190 mM glisin içeren tamponda nitroseluloz memrana (0,45 mm por büyüklüğüne sahip) 60 mA akım ile bir saat süreyle (semi-dry) blotlama cihazında transfer gerçekleştirilir. %0,1 Tween-20, 140 mM NaCl içeren 20 mM Tris tamponunun (pH: 7,6) hacmine oranla %3 BSA (sığır serum albumini)ve %5 süt tozu katılır ve membranlar bu çözeltide 4°C'de bir gece inkübe edilir. Memran % 0,1 Tween-20'de yıkandıktan sonra AOX' e karşı *Sauromatum guttatum* dan elde edilen monoklonal antikolar (Elthon *et al.* 1989) (1: 100oranında seyreltilmiş) içeren tween-20 de % 5 süt tozuyla bir saat oda sıcaklığında inkübe edilir. 4 kez 5'er dakika %0,1 Tween-20'de yıkanan membran, yabanturpu peroksidazına bağlanmış anti-mouse sekonder antikolarını (1:10000oranında seyreltilen) içeren %0,1 Tween-20 ve %2 süt tozunda iki saat oda sıcaklığında inkübasyona bırakılır. Memran 6 kez 5'er dakika %0,1 Tween-20 ile yıkanır. Cross-reacted antikor SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce, Perbio Science UK) kullanılarak AOX protein bantları saptanır.

3.3.13. İstatistiksel analiz

Tez içerisinde sunulan sonuçlar, her bir uygulamadan üç örnek (3 paralel) ve her bir örnekten 2 tekerrür yapıldıktan sonra elde edilen 6 değer in ortalamasıdır. Sonuçların karşılaştırılması, SPSS 20 paket programı kullanılarak tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile yapılmış $p < 0.05$ önem seviyesinde Duncan'ın Çoklu Karşılaştırma Testi kullanılarak belirlenmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Araştırmamızda uygulama yapılacak maddelerin en uygun konsantrasyonlarını bulmak için literatür verilerinden yararlanarak ön çalışmalar yapılmıştır. Bu ön çalışmalarda azid için 2, 4, 6, 8, 10 mM konsantrasyonları, antimisin A için 2, 4, 6, 8, 10 µM konsantrasyonları, piruvat için 2.5, 5, 7.5, 10 mM konsantrasyonları ve SHAM için 2, 4, 6, 8, 10 mM konsantrasyonları eksojen olarak nohut ve buğdaya uygulanmış, bitkiler daha sonra soğuk şartlara aktarılmıştır. Soğuk uygulamasından 48 saat sonra hasat edilen bitkilerin MDA düzeyleri ve süperoksit miktarlarına bakılarak en düşük değerler belirlenmiştir. SHAM uygulamasında ise en yüksek değerler tespit edilmiştir. Ön çalışmalarda en uygun konsantrasyonların 2 mM azid, 2 µM antimisin A, 5 mM piruvat ve 4 mM SHAM olduğu saptanmıştır. Çalışmaya bu konsantrasyonlardaki uygulamalarla devam edilmesine karar verilmiştir. Bu uygulamalardan sonra nohut ve buğday gruplarının fizyolojik ve moleküler parametreleri tespit edilmiştir.

4.1. Antioksidan Enzim Aktiviteleri ve İzoenzim Sonuçları

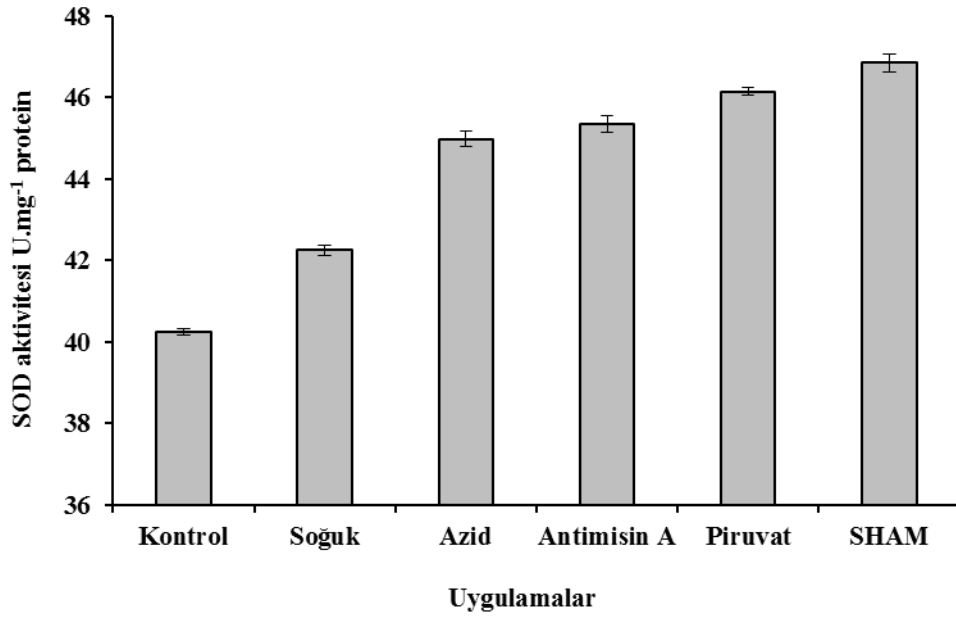
4.1.1. SOD aktivitesi ve izoenzim sonuçları

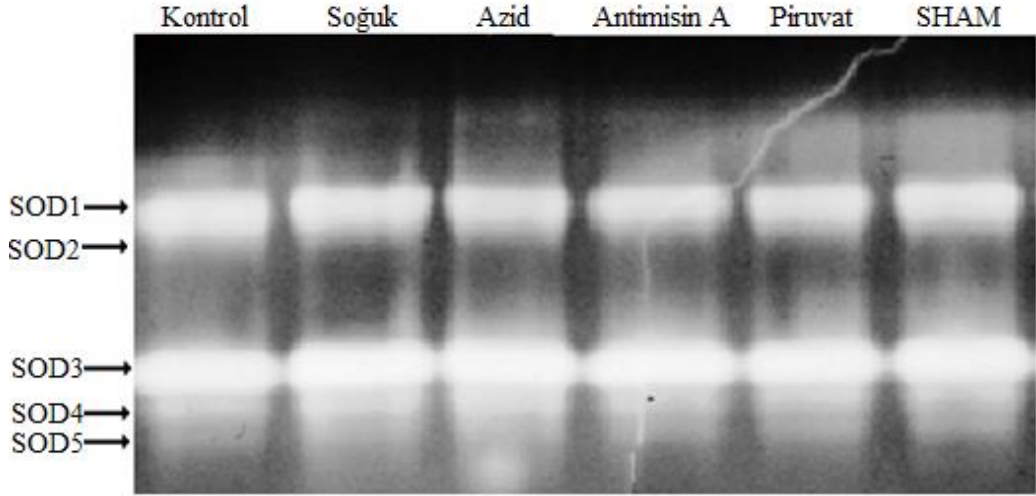
Nohut bitkisinin kontrol grubunda SOD aktivitesi 40.25 U.mg^{-1} protein değerinde ölçülürken soğuk uygulaması SOD aktivitesini %5 artırarak 42.25 U.mg^{-1} protein değerine ulaşmasına neden olmuştur. Soğuk uygulamasına göre 2 mM azid, 2 µM antimisin A, 5 mM piruvat ve 4 mM SHAM uygulamaları sırasıyla %6.5, %7.3, %9.2 ve %10.9 oranlarında SOD aktivitesini artırdıkları tespit edilmiş yine sırasıyla bu uygulamalarda ki SOD aktivitesi değeri $44.98, 45.35, 46.15, 46.85 \text{ U.mg}^{-1}$ protein olarak ölçülmüştür. 2 mM azid ve 2µM antimisin A uygulamalarından elde edilen değerler istatistiki olarak önemsiz ($P>0.05$), diğer uygulamalarda ise belirgin farklılıklar olduğu saptanmıştır (Çizelge 4.1), (Şekil 4.1), ($P<0.05$).

Çizelge 4.1. Nohut bitkisinde uygulamalara göre SOD aktivitesinin değişimi

Uygulamalar	SOD aktivitesi (U.mg ⁻¹ protein)
Kontrol	40.25±0.081e*
Soğuk	42.25±0.115d
2 mM Azid	44.98±0.185c
2 µM Antimisin A	45.35±0.196c
5 mM Piruvat	46.15±0.087b
4 mM SHAM	46.85±0.214a

* Bir sütun içinde aynı harflerin bulunduğu gruplar arasındaki farklılıklar $P < 0.05$ önem seviyesine göre anlamsızdır.

**Şekil 4.1.** Azid, antimisin A, piruvat ve SHAM uygulamalarının nohut bitkisinde SOD aktivitesi üzerine etkileri



Şekil 4.2. Nohut bitkisine azid, antimisin A, piruvat ve SHAM uygulamalarının SOD izoenzimleri üzerine etkisi

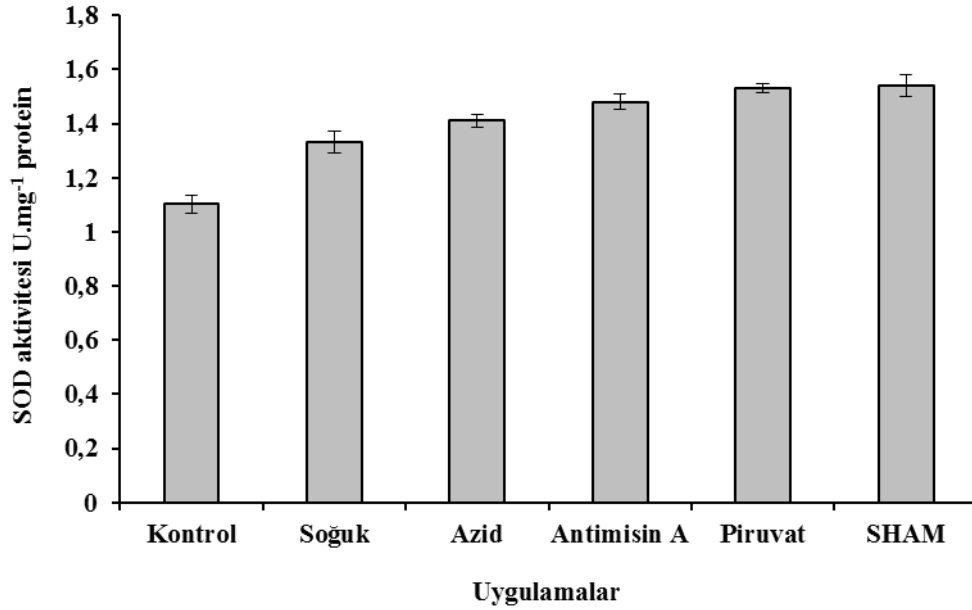
SOD izoenzim bantlarında; SOD2, SOD3, SOD4 ve SOD5 izoenzim bantlarının yoğunlukları soğuk ve diğer uygulamalar ile arttığı belirlenmiştir.

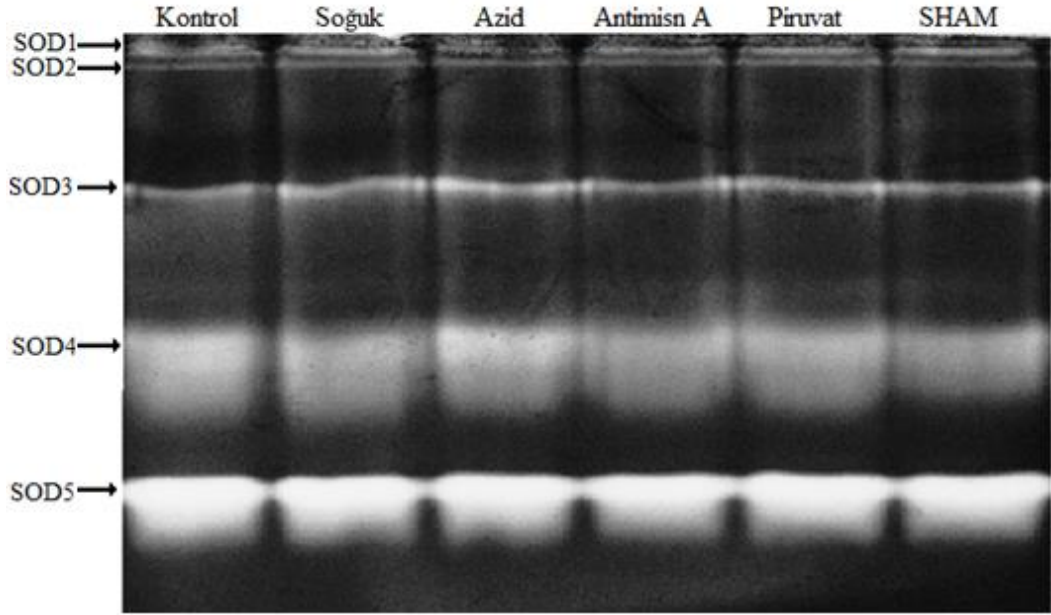
Buğday bitkisinde de soğuk uygulaması ve soğuk ile birlikte diğer uygulamaların hepsi SOD aktivitesini kontrol grubuna göre önemli değerlerde artırdığı gözlemlendi. Kontrol bitkisinde 1.1 U.mg^{-1} protein olarak ölçülen SOD aktivitesini soğuk uygulaması %20.7 oranında artırarak 1.33 U.mg^{-1} protein seviyesine ulaştırdığı belirlendi. Soğuk uygulamasına göre 2 mM azid ve 2 μM antimisin A uygulamaları SOD aktivitesini %6, %11.3 artırmış ancak istatistiki olarak önemsiz bir artış olduğu belirlenmiştir ($P>0.05$). AOX aktivatörü 5 mM piruvat ve AOX inhibitörü 4 mM SHAM uygulamaları ise SOD aktivitesini soğuk uygulamasına göre sırasıyla %15 ve %15.8 oranlarında artırarak 1.53 ve 1.54 U.mg^{-1} protein değerlerine ulaştırmıştır (Çizelge 4.2), (Şekil 4.3), ($P<0.05$).

Çizelge 4.2. Buğday bitkisinde uygulamalara göre SOD aktivitesinin değişimi

Uygulamalar	SOD aktivitesi (U.mg ⁻¹ protein)
Kontrol	1.10±0.0347d*
Soğuk	1.33±0.0404b
2 mM Azid	1.41±0.0231bc
2 µM Antimisin A	1.48±0.0289ab
5 mM Piruvat	1.53±0.0173a
4 mM SHAM	1.54±0.0404a

* Bir sütun içinde aynı harflerin bulunduğu gruplar arasındaki farklılıklar $P < 0.05$ önem seviyesine göre anlamsızdır.

**Şekil 4.3.** Azid, antimisin A, piruvat ve SHAM uygulamalarının buğday bitkisinde SOD aktivitesi üzerine etkileri



Şekil 4.4. Buğday bitkisine azid, antimisin A, piruvat ve SHAM uygulamalarının SOD izoenzimleri üzerine etkisi

Buğday bitkisinde SOD izoenzimlerinin uygulamalara göre değişimi yukarıdaki gibi belirlenmiştir.

4.1.2. POD aktivitesi sonuçları

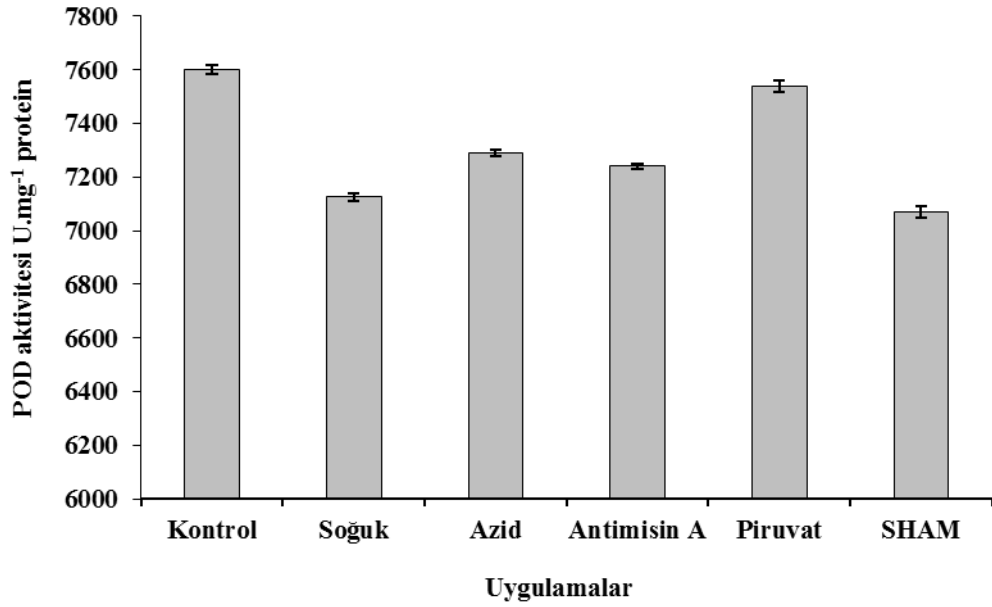
Nohut bitkisinde kontrol grubu bitkilerine göre tüm uygulamaların POD aktivitesinde önemli derecede düşüşe neden olduğu saptanmıştır. Kontrol grubu bitkilerde POD enzim aktivitesi 7600 U.mg^{-1} protein olarak ölçülmüşken soğuk uygulamasında bu değer 7125 U.mg^{-1} proteine gerilemiştir ($P>0.05$). POD aktivitesinde yalnız soğuk uygulaması yapılan bitkilerde kontrol bitkisine göre % 6.3 azalma olduğu belirlenmiştir. Soğuk ile birlikte solunum inhibitörlerinin ve piruvat uygulaması soğuk uygulamasına göre POD aktivitesini artırdığı saptandı. Enzim aktiviteleri, soğuk uygulamasına göre 2mM azid uygulaması %2.3 artışla 7290 U.mg^{-1} protein, $2\mu\text{M}$ antimisin A uygulaması %1.6 artışla 7240 U.mg^{-1} protein olarak ölçülürken 5mM piruvat uygulamasında ise %5.8 artışla 7540 U.mg^{-1} protein olarak belirlendi ($P<0.05$). AOX inhibitörü olan 4mM SHAM uygulaması ise soğuk uygulamasına göre %0.8 enzim aktivitesi düşüşüne neden olduğu saptandı. POD enzim aktivitesinin en düşük değeri

7070 U.mg⁻¹ protein ile 4mM SHAM uygulaması ile tespit edildi (Çizelge 4.3),(Şekil 4.5).

Çizelge 4.3. Nohut bitkisinde uygulamalara göre POD aktivitesinin değişimi

Uygulamalar	POD aktivitesi (U.mg ⁻¹ protein)
Kontrol	7600±16.166a*
Soğuk	7125±14.434e
2 mM Azid	7290±9.815c
2 µM Antimisin A	7240±8.660d
5 mM Piruvat	7540±20.207b
4 mM SHAM	7070±19.630f

* Bir sütun içinde aynı harflerin bulunduğu gruplar arasındaki farklılıklar $P < 0.05$ önem seviyesine göre anlamsızdır.



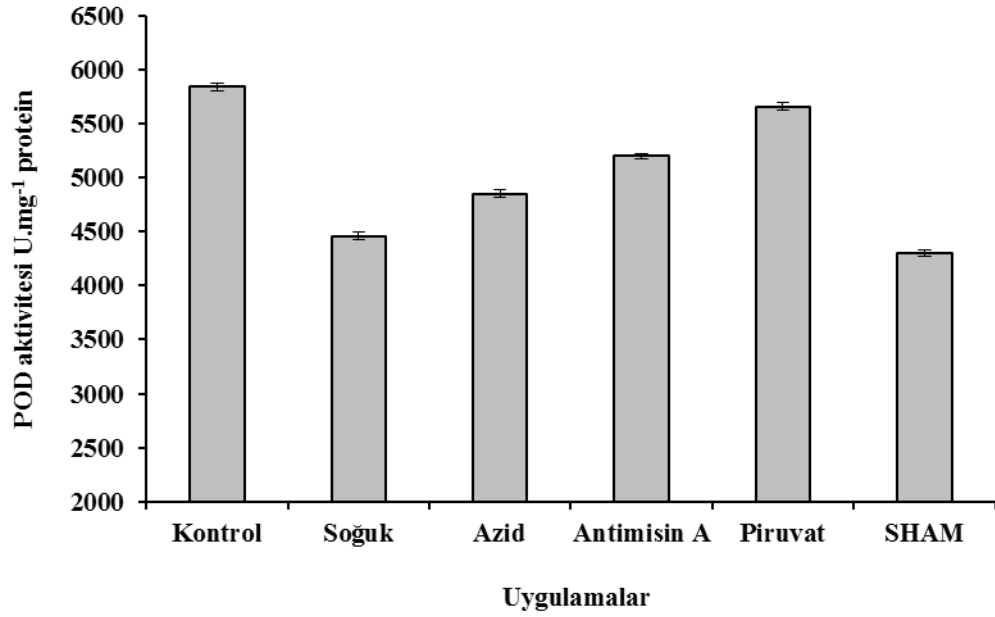
Şekil 4.5. Azid, antimisin A, piruvat ve SHAM uygulamalarının nohut bitkisinde POD aktivitesi üzerine etkileri

Buğday bitkisi yapraklarından alınan numunelerde de nohut bitkisine paralel sonuçlar elde edildi. Kontrol bitkisine göre soğuk uygulaması ve diğer uygulamalarda da POD aktivitesinde önemli değerde düşüş olduğu belirlendi ($P < 0.05$). Kontrol bitkisinde enzim aktivitesi 5840 U.mg^{-1} protein olarak belirlenirken soğuk uygulaması ile %23,6 değerinde bir düşüşle 4460 U.mg^{-1} protein olarak kaydedildi. Soğuk şartlarda 2 mM azid, 2 μM antimisin A, 5 mM piruvat uygulamaları soğuk uygulamasına göre sırası ile %8.7, %16.6 ve %26.9'luk bir aktivite artışına neden oldukları belirlendi. Aynı sıraya göre enzim aktiviteleri ise 4850, 5200 ve 5660 U.mg^{-1} protein olarak ölçülmüştür ($P < 0.05$). Soğuk uygulamasına kıyasla 4 mM SHAM uygulaması ise POD enzim aktivitesinde %3.6 düşüşe neden olmuş ve enzim aktivite değeri 4300 U.mg^{-1} protein olarak belirlenmiştir(Çizelge 4.4),(Şekil 4.7).

Çizelge 4.4. Buğday bitkisinde uygulamalara göre POD aktivitesinin değişimi

Uygulamalar	POD aktivitesi (U.mg^{-1} protein)
Kontrol	$5840 \pm 40.415a^*$
Soğuk	$4460 \pm 34.641e$
2 mM Azid	$4850 \pm 37.528d$
2 μM Antimisin A	$5200 \pm 25.981c$
5 mM Piruvat	$5660 \pm 34.641b$
4 mM SHAM	$4300 \pm 31.754f$

* Bir sütun içinde aynı harflerin bulunduğu gruplar arasındaki farklılıklar $P < 0.05$ önem seviyesine göre anlamsızdır.



Şekil 4.6. Azid, antimisin A, piruvat ve SHAM uygulamalarının buğday bitkisinde POD aktivitesi üzerine etkileri

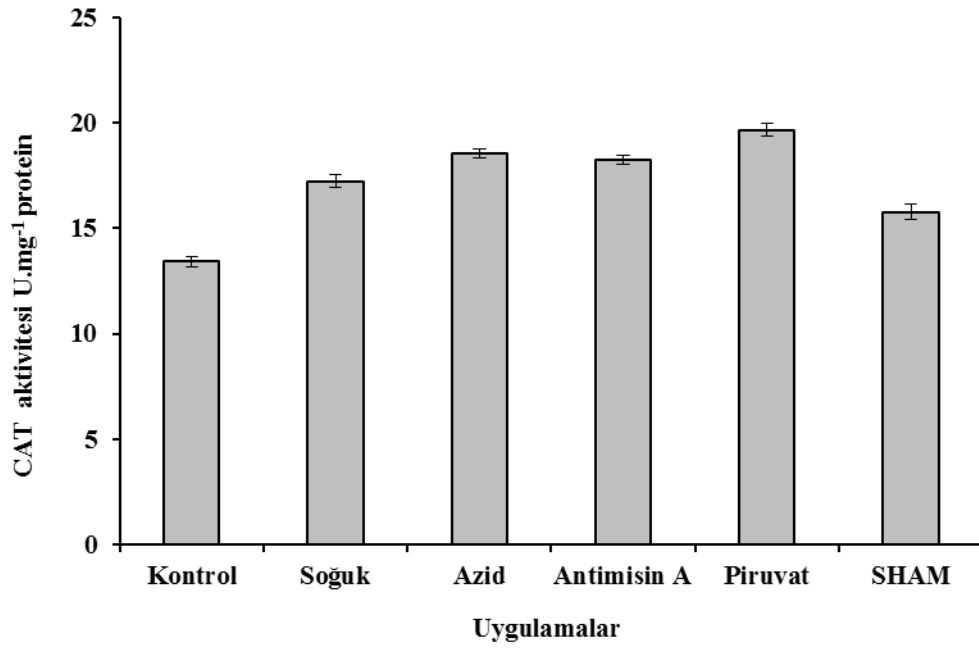
4.1.3. CAT aktivitesi sonuçları

Nohut bitkisi yapraklarında CAT aktivitesi soğuk, 2 mM azid ve 2 μ M antimisin A ve 5 mM piruvat uygulamalarının tümünde kontrol bitkisine kıyasla önemli derecelerde arttığı tespit edildi ($P < 0.05$). Yalnız soğuk uygulaması ile kontrol bitkisine göre %28.2 artışla 17.22 U.mg⁻¹ protein değeri elde edilirken, CAT aktivitesini soğuk uygulaması ile birlikte 2 mM azid, 2 μ M antimisin A ve 5 mM piruvat uygulamaları soğuk uygulamasına göre sırasıyla %7.8, %6 ve %14.2 oranlarında artırarak 2 mM azid uygulaması ile 18.56, 2 μ M antimisin A uygulaması ile 18.25 ve 5 mM piruvat uygulaması ile 19.66 U.mg⁻¹ protein aktivite değerleri elde edilmiştir. AOX inhibitörü olarak kabul edilen 4 mM SHAM uygulaması ise CAT enzim aktivitesini yalnız soğuk uygulamasına göre %8.4 oranında azalttığı ve enzim aktivitesinin 15.78 U.min⁻¹.mg⁻¹ protein olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.5),(Şekil 4.9) ($P < 0.05$).

Çizelge 4.5. Nohut bitkisinde uygulamalara göre CAT aktivitesinin değışimi

Uygulamalar	CAT aktivitesi (U.mg ⁻¹ protein)
Kontrol	13.43±0.248e*
Soğuk	17.22±0.296c
2 mM Azid	18.56±0.208b
2 µM Antimisin A	18.25±0.231b
5 mM Piruvat	19.66±0.312a
4 mM SHAM	15.78±0.393d

* Bir sütun içinde aynı harflerin bulunduğu gruplar arasındaki farklılıklar $P < 0.05$ önem seviyesine göre anlamsızdır.

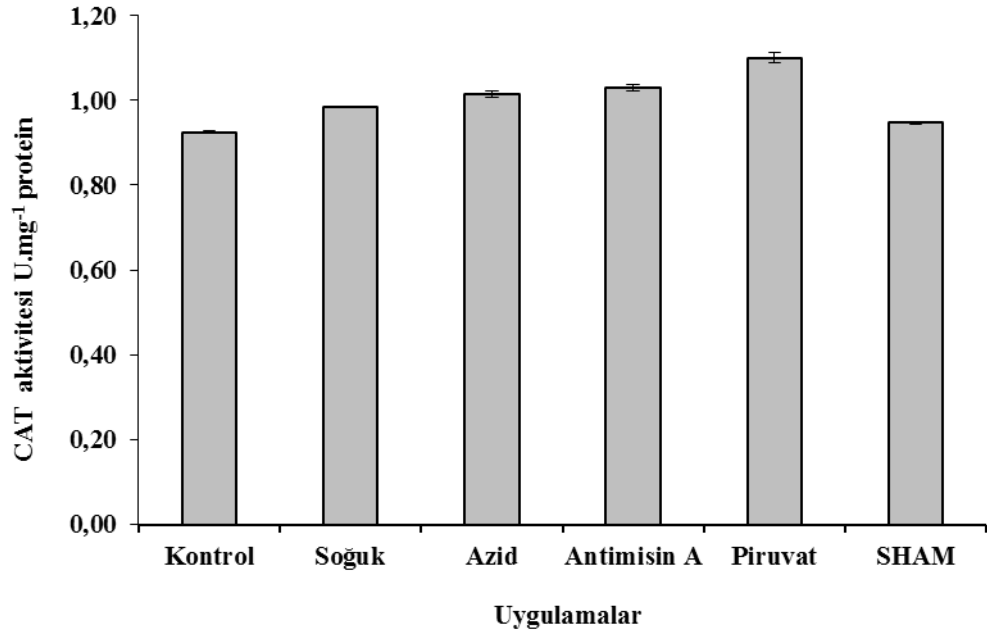
**Şekil 4.7.** Azid, antimisin A, piruvat ve SHAM uygulamalarının nohut bitkisinde CAT aktivitesi üzerine etkileri

Buğday bitkisinden elde edilen CAT enzim aktivitesi değerlerindeki değişimler de nohut bitkisindekilere paralel olduğu görüldü. Kontrol bitkisinde CAT aktivitesi 0.925 iken, soğuk uygulaması ile %6.4'lük artışla 0.984 CAT aktivitesi U.mg⁻¹ proteine kadar ulaştığı saptandı. Soğuk uygulamasına göre aynı şartlarda uygulanan 2 mM azid uygulaması %3 artışla 1.014, 2 µM antimisin A uygulaması %4.6 artışla 1.029 ve 5 mM piruvat uygulaması ise %11.8 artışla 1.1 U.mg⁻¹ protein değerlerine kadar artırdıkları belirlendi. Soğuk uygulamasına kıyasla 4 mM SHAM uygulaması ise CAT aktivitesinin düşmesine neden olmuştur. AOX inhibitörü 4 mM SHAM uygulaması CAT aktivitesini soğuğa kıyasla %3.8 azaltarak 0.947 U.mg⁻¹ protein değerine kadar indirmediği belirlendi (Çizelge 4.6),(Şekil 4.10)($P < 0.05$).

Çizelge 4.6. Buğday bitkisinde uygulamalara göre CAT aktivitesinin değişimi

Uygulamalar	CAT aktivitesi (U.mg ⁻¹ protein)
Kontrol	0.925±0.0025e*
Soğuk	0.984±0.0029c
2 mM Azid	1.014±0.0081b
2 µM Antimisin A	1.029±0.0069b
5 mM Piruvat	1.100±0.0127a
4 mM SHAM	0.947±0.0035d

* Bir sütun içinde aynı harflerin bulunduğu gruplar arasındaki farklılıklar $P < 0.05$ önem seviyesine göre anlamsızdır.



Şekil 4.8. Azid, antimisin A, piruvat ve SHAM uygulamalarının buğday bitkisinde CAT aktivitesi üzerine etkileri

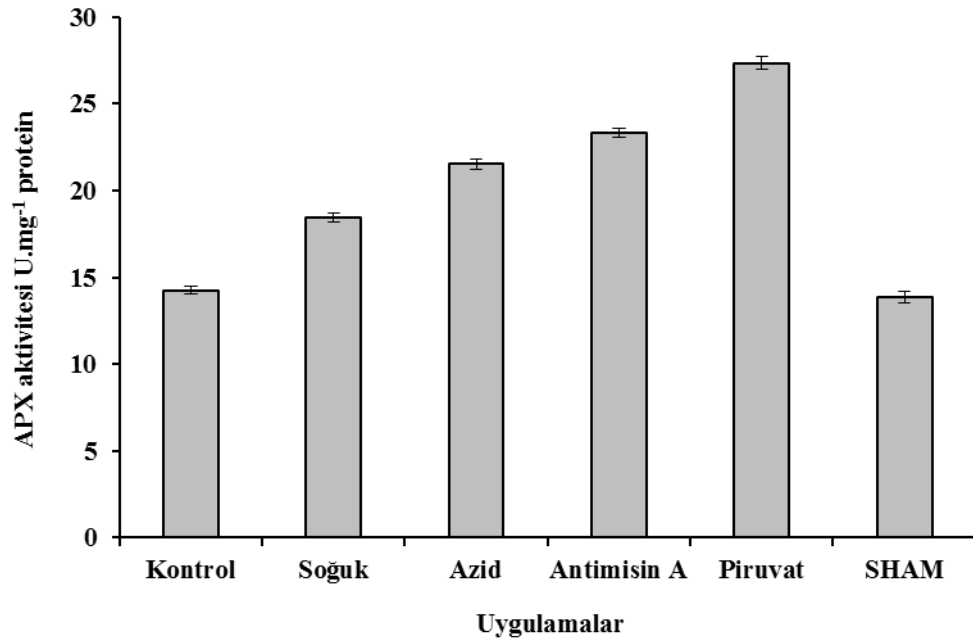
4.1.4. APX aktivitesi ve izoenzim sonuçları

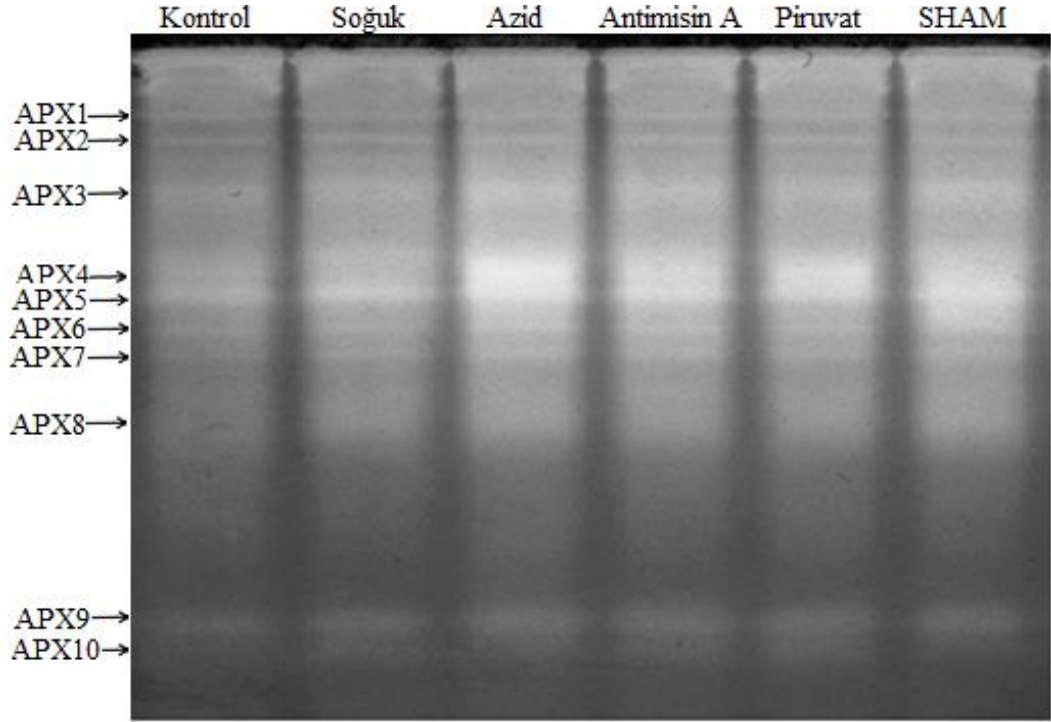
Nohut bitkisinde soğuk uygulaması APX aktivitesini %29.3 düzeyinde artırmıştır. Kontrol bitkisinde enzim aktivitesi değeri 14.26 U.mg⁻¹ protein olarak ölçülürken soğuk uygulamasıyla 18.44 U.mg⁻¹ protein olarak ölçülmüştür. Solunum inhibitörlerinden 2 mM azid ve 2 µM antimisin A uygulamaları APX enzim aktivitesini soğuk uygulamasına göre sırası ile %16.8 ve %26.6 oranında artırarak 21.53 ve 23.34 U.mg⁻¹ protein değerlerine ulaştırmışlardır. Soğuk uygulamasına göre, AOX aktivatörü olan 5 mM piruvat uygulaması da enzim aktivitesini solunum inhibitörleri gibi ciddi değerde artırdığı tespit edilmiştir. APX aktivitesinde 5 mM piruvat uygulaması soğuk uygulamasına göre %48.2 artışa neden olurken bu uygulama sonucunda enzim aktivitesi değeri 27.33 U.mg⁻¹ protein olarak saptanmıştır. Bir AOX inhibitörü olan 4 mM SHAM uygulaması ise soğuk uygulamasına göre APX aktivitesinde %24.8 düşüşe neden olurken enzim aktivitesinin 13.86 U.mg⁻¹ protein değerine gerilemesine neden olmuştur(Çizelge 4.7), (Şekil 4.11), ($P<0.05$).

Çizelge 4.7. Nohut bitkisinde uygulamalara göre APX aktivitesinin değişimi

Uygulamalar	APX aktivitesi (U.mg ⁻¹ protein)
Kontrol	14.26±0.237e*
Soğuk	18.44±0.254d
2 mM Azid	21.53±0.306c
2 µM Antimisin A	23.34±0.254b
5 mM Piruvat	27.33±0.370a
4 mM SHAM	13.86±0.346e

* Bir sütun içinde aynı harflerin bulunduğu gruplar arasındaki farklılıklar $P < 0.05$ önem seviyesine göre anlamsızdır.

**Şekil 4.9.** Azid, antimisin A, piruvat ve SHAM uygulamalarının nohut bitkisinde APX aktivitesi üzerine etkileri



Şekil 4.10. Nohut bitkisine azid, antimisin A, piruvat ve SHAM uygulamalarının APX izoenzimleri üzerine etkileri

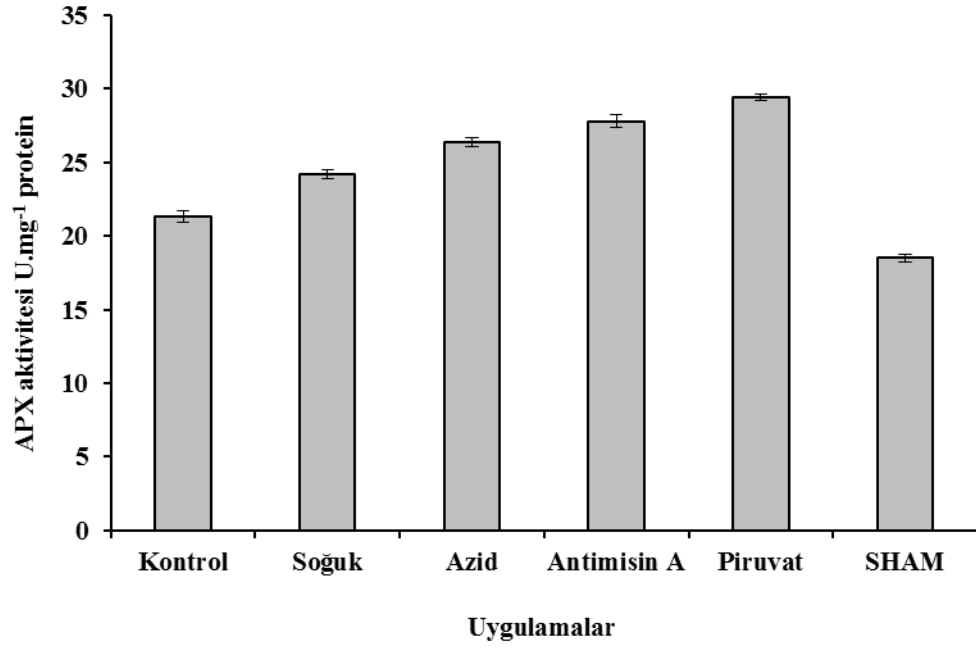
Nohut yapraklarından elde edilen enzim ekstraktları ile poliakrilamid jel üzerinde APX izoenzimleri belirlenmiştir. Kontrol bitkisi ve soğuk uygulamasında jelin alt kısmına doğru farklı bir izoenzim bandı (APX10) tespit edilmesinin yanında soğuk uygulaması ile bantların yoğunluğu az miktarda arttığı görülmektedir. 2 mM azid, 2 μ M antimisin A ve 5 mM piruvat uygulamalarında soğuk uygulamasına göre ekstra bir izoenzim bandı tespit edilmesinin yanında soğuk uygulamasında var olan bantlarında yoğunluğu belirgin şekilde artmıştır. 4 mM SHAM uygulamasında ise solunum inhibitörleri ve AOX aktivatörlerinin uygulanması ile elde edilen farklı izoenzim bandı görülmemektedir.

Buğday gruplarında da nohut bitkisindeki APX aktivitesi değişimlerine benzer sonuçlar elde edilmiştir. Kontrol grubuna göre soğuk, 2 mM azid, 2 μ M antimisin A ve 5 mM piruvat uygulamalarının hepsi önemli düzeyde enzim aktivitesi artışına neden oldukları saptanmıştır ($P < 0.05$). Kontrol grubunda 21.3 U.mg⁻¹ protein olarak ölçülen enzim aktivitesi soğuk uygulaması ile %13.6 oranında artışla 24.2 nmol.min⁻¹.mg⁻¹ protein değerine ulaşmıştır. APX aktivitesini 2 mM azid, 2 μ M antimisin A ve 5 mM piruvat uygulamaları ise soğuk uygulamasına göre sırasıyla %9.1, %14.9 ve %21.5 artırmışlar ve bu uygulamalardaki aktivite değerleri 26.4, 27.8 ve 29.4 U.mg⁻¹ protein olarak ölçülmüştür. APX aktivitesinde 4 mM SHAM uygulaması ise soğuk uygulamasına göre önemli düşüşe neden olduğu belirlenmiştir. 4 mM SHAM uygulaması APX aktivitesini soğuk uygulamasına göre %23.6 düşürürken, bu uygulamada ki enzim aktivitesi değeri 18.5 U.mg⁻¹ protein olarak ölçülmüştür (Çizelge 4.8),(Şekil 4.13)($P < 0.05$).

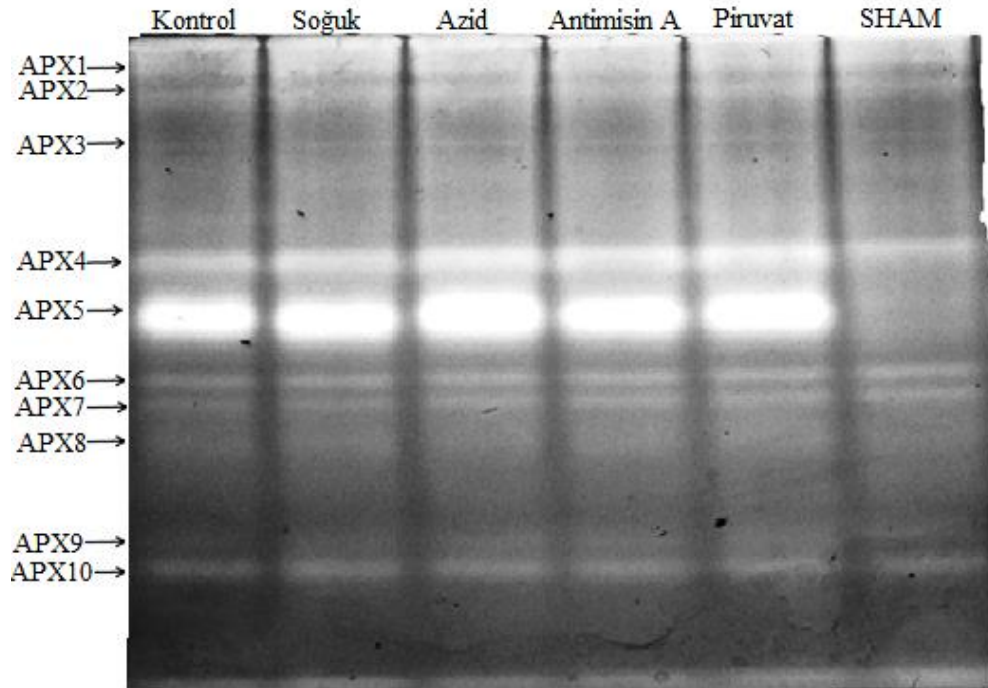
Çizelge 4.8. Buğday bitkisinde uygulamalara göre APX aktivitesinin değişimi

Uygulamalar	APX aktivitesi (U.mg ⁻¹ protein)
Kontrol	21.3±0.404e*
Soğuk	24.2±0.289d
2 mM Azid	26.4±0.289c
2 μ M Antimisin A	27.8±0.404b
5 mM Piruvat	29.4±0.231a
4 mM SHAM	18.5±0.260f

* Bir sütun içinde aynı harflerin bulunduğu gruplar arasındaki farklılıklar $P < 0.05$ önem seviyesine göre anlamsızdır.



Şekil 4.11. Azid, antimisin A, piruvat ve SHAM uygulamalarının buğday bitkisinde APX aktivitesi üzerine etkileri



Şekil 4.12. Buğday bitkisine azid, antimisin A, piruvat ve SHAM uygulamalarının APX izoenzimleri üzerine etkileri

Buğday bitkisi yaprak dokusunun APX izoenzimleri tespit edilmiş ve çok belirgin farklılıklar görülmüştür. Kontrol grubuna kıyasla soğuk uygulamasında izoenzim bantlarının yoğunlaştığı görülmüştür. Soğuk uygulamasına kıyasla 2 mM azid, 2 µM antimisin A ve 5 mM piruvat uygulamalarında soğuk uygulamasına göre bantların yoğunluğu ciddi oranda arttığı gözlenmektedir. 4 mM SHAM uygulaması ile diğer tüm uygulamalarda en yüksek yoğunluklu bant olarak görülebilen APX5 izoenzim bandı görülememektedir. Özellikle APX5, APX9 ve APX10 izoenzim bantlarında yoğunluklarının soğuk ve diğer uygulamalarla arttığı görülmektedir.

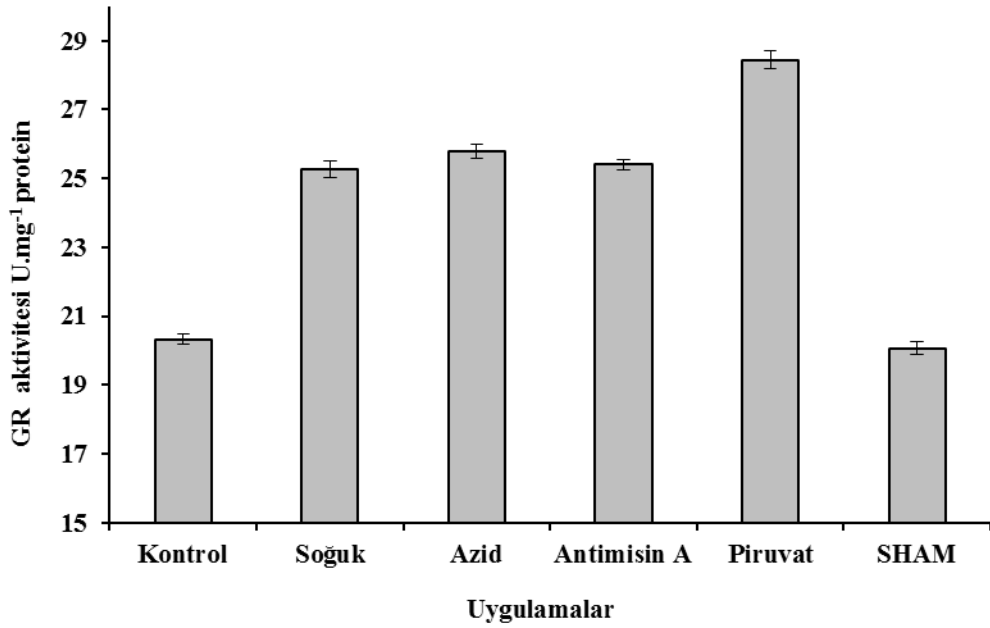
4.1.5. GR aktivitesi sonuçları

Nohut bitkisinin soğuk stresine maruz kalması GR aktivitesinde önemli oranda artışa neden olmuştur. Kontrol bitkisinde 20.33 U.mg⁻¹ protein olarak belirlenen enzim aktivitesini soğuk uygulaması %24.2 oranında artırarak 25.26 U.mg⁻¹ protein değerlerine ulaştırmıştır. Yalnız soğuk uygulamasına kıyasla 2 mM azid, 2 µM antimisin A uygulamaları ise GR aktivitesini istatistiki olarak önemsiz sayılacak düzeylerde artırmıştır. Soğuk uygulamasına göre 5 mM piruvat uygulaması sonucunda ise %12.6 oranında bir artış belirlenmiş ve bu uygulama sonucunda GR aktivitesi 28.45 U.mg⁻¹ protein olarak ölçülmüştür. AOX inhibitörü 4 mM SHAM uygulaması ise GR aktivitesini soğuk uygulamasına göre %20.6 oranında azaltarak 20.06 U.mg⁻¹ protein değerine düşmesine neden olmuştur (Çizelge 4.9), (Şekil 4.15), ($P<0.05$).

Çizelge 4.9. Nohut bitkisinde uygulamalara göre GR aktivitesinin değişimi

Uygulamalar	GR aktivitesi (U.mg ⁻¹ protein)
Kontrol	20.33±0.153c*
Soğuk	25.26±0.254b
2 mM Azid	25.79±0.219b
2 µM Antimisin A	25.40±0.156b
5 mM Piruvat	28.45±0.266a
4 mM SHAM	20.06±0.179c

* Bir sütun içinde aynı harflerin bulunduğu gruplar arasındaki farklılıklar $P < 0.05$ önem seviyesine göre anlamsızdır.

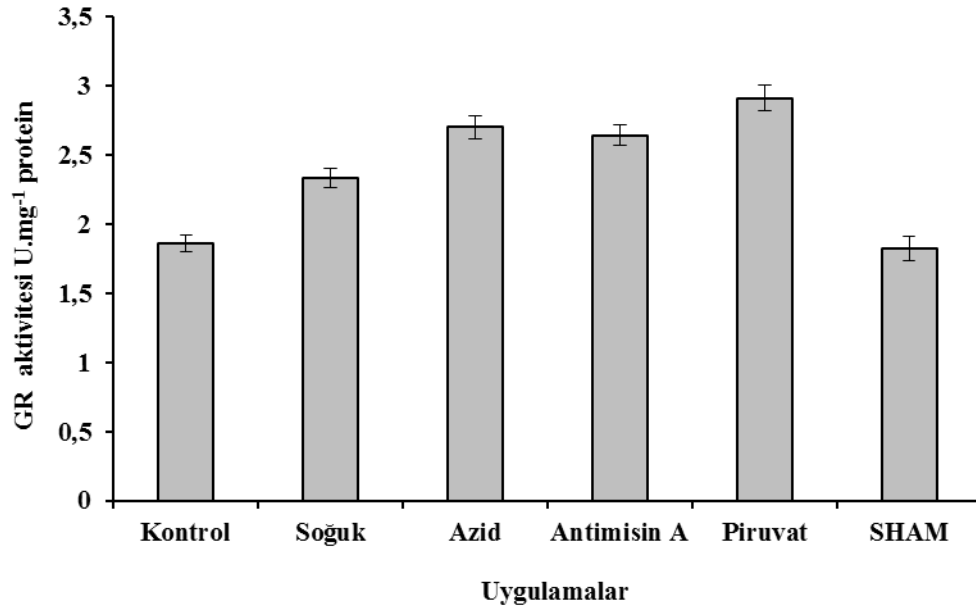
**Şekil 4.13.** Azid, antimisin A, piruvat ve SHAM uygulamalarının nohut bitkisinde GR aktivitesi üzerine etkileri

Buğday bitkisinde GR aktivitesi kontrol bitkisinde 1.86 U.mg^{-1} protein değerinde ölçülürken soğuk uygulaması bu değeri %25.3 artırarak 2.33 U.mg^{-1} protein değerine ulaşmasına neden olmuştur. Soğuk uygulamasına göre azid, antimisin A ve piruvat uygulamaları GR aktivitesini sırasıyla %15.9, %13.3 ve %24.9 artırmıştır. Bu uygulamalarda sırasıyla 2.70 , 2.64 ve 2.91 U.mg^{-1} protein değerlerine ulaştırmıştır. Soğuk uygulamasına kıyasla SHAM uygulaması GR enzim aktivitesini %21.9 oranında azaltarak 1.82 U.mg^{-1} protein değerine düşürmüştür (Çizelge 4.10),(Şekil 4.16)($P < 0.05$).

Çizelge 4.10. Buğday bitkisinde uygulamalara göre GR aktivitesinin değişimi

Uygulamalar	GR aktivitesi (U.mg^{-1} protein)
Kontrol	$1.86 \pm 0.064d^*$
Soğuk	$2.33 \pm 0.069c$
2 mM Azid	$2.70 \pm 0.081ab$
2 μM Antimisin A	$2.64 \pm 0.075b$
5 mM Piruvat	$2.91 \pm 0.092a$
4 mM SHAM	$1.82 \pm 0.087d$

* Bir sütun içinde aynı harflerin bulunduğu gruplar arasındaki farklılıklar $P < 0.05$ önem seviyesine göre anlamsızdır.



Şekil 4.14. Azid, antimisin A, piruvat ve SHAM uygulamalarının buğday bitkisinde GR aktivitesi üzerine etkileri

4.2. Antioksidan Madde İçeriği Sonuçları

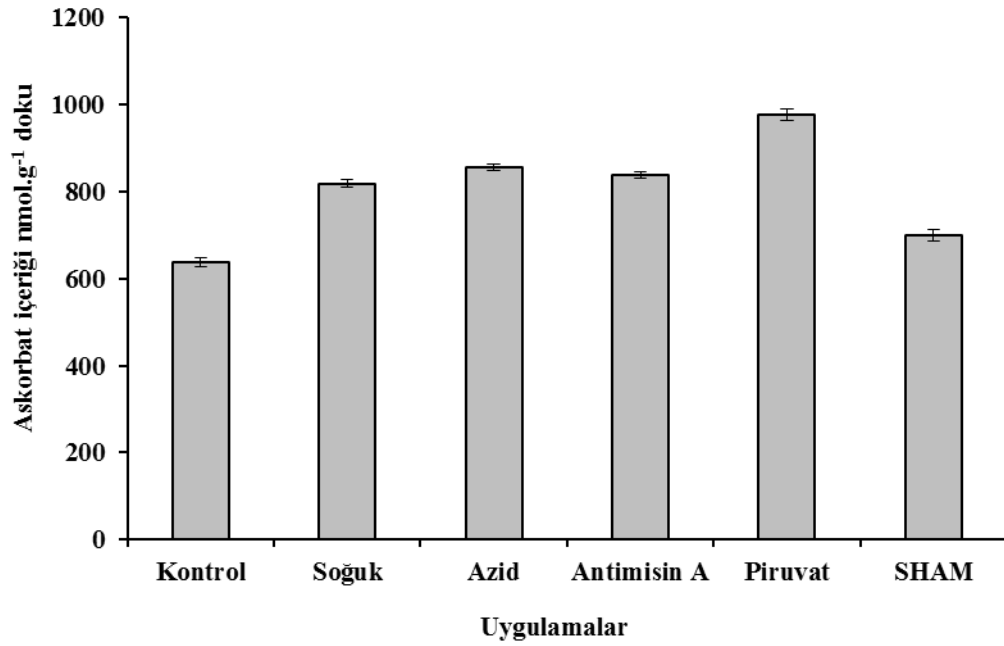
4.2.1. Askorbat içeriği sonuçları

Soğuk uygulaması nohut bitkisinde kontrol grubuna göre askorbat içeriğini önemli derecede artırmıştır. Kontrol grubunda 638 nmol.g^{-1} doku değerinde ölçülen askorbat miktarını yalnız soğuk uygulaması %28.4 artırarak 819 nmol.g^{-1} doku değerine kadar yükseltmiştir ($P<0.05$). Soğuk uygulamasına göre 2 mM Azid, 2 μM Antimisin A ve 5 mM piruvat uygulamaları askorbat içeriğini sırasıyla %4.4, %2.3 ve %19.3 oranlarında artırdıkları belirlenmiştir. Soğuk uygulamasına göre askorbat içeriğinin en yüksek değeri 5 mM piruvat uygulaması sonucu 977 nmol.g^{-1} doku değerinde olduğu saptanmıştır ($P<0.05$). AOX inhibitörü 4 mM SHAM uygulaması ise askorbat içeriğinde ciddi düşüşe yol açmıştır. Soğuk grubuna göre 4 mM SHAM uygulaması ile askorbat içeriği %14.7 düşüş göstererek 699 nmol.g^{-1} doku değerine gerilemiştir (Çizelge 4.11), (Şekil 4.17), ($P<0.05$).

Çizelge 4.11. Nohut bitkisinde uygulamalara göre askorbat içeriğindeki değişimler

Uygulamalar	Askorbat (nmol.g ⁻¹ doku)
Kontrol	638±9.815e*
Soğuk	819±7.506c
2 mM Azid	855±6.928b
2 µM Antimisin A	838±6.351bc
5 mM Piruvat	977±12.124a
4 mM SHAM	699±13.856d

* Bir sütun içinde aynı harflerin bulunduğu gruplar arasındaki farklılıklar $P < 0.05$ önem seviyesine göre anlamsızdır.

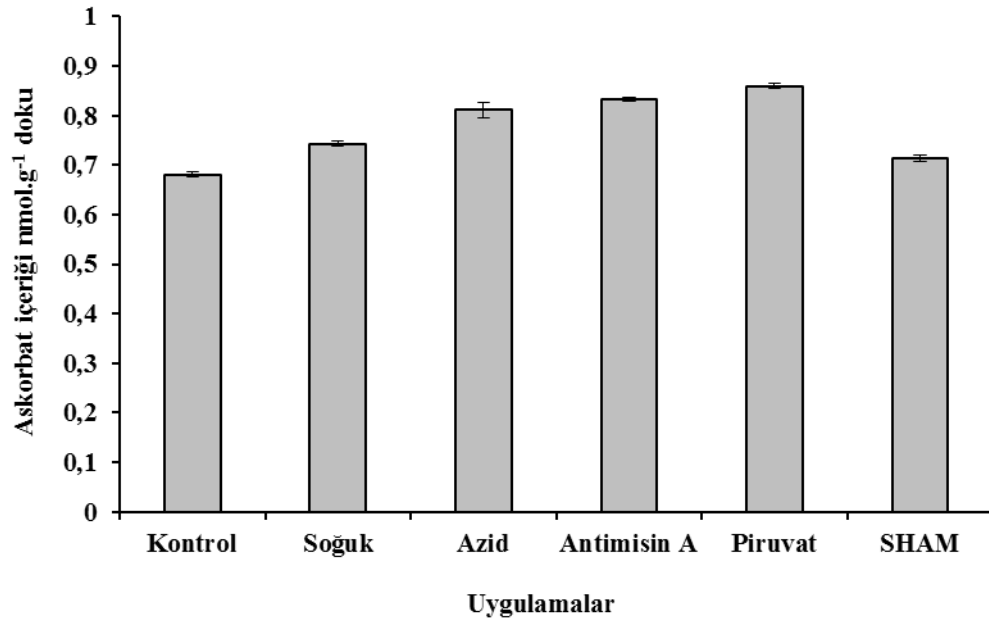
**Şekil 4.15.** Azid, antimisin A, piruvat ve SHAM uygulamalarının nohut bitkisinde askorbat içeriği üzerine etkileri

Buğday bitkilerinde askorbat içeriği soğuk uygulaması ile kontrol gruplarına göre %9.3 oranında artarak $0.743 \text{ nmol.g}^{-1}$ doku değerine kadar yükselmiştir (Çizelge 4.12). Soğuk grubuna göre 2 mM Azid, 2 μM Antimisin A ve 5 mM Piruvat uygulamaları sonucu askorbat içeriği sırasıyla %9.2, %12.1 ve %15.6 oranlarında artış göstermiştir. Bu uygulamalarla askorbat içerinden elde edilen sonuçlar sırasıyla 0.811, 0.833 ve 0.859 nmol.g^{-1} doku değerleri olmuştur. 4 mM SHAM uygulaması ise askorbat içeriğini soğuk grubuna göre %3.9 oranında düşürmüştür. Bu uygulamayla askorbat içeriği $0.714 \text{ nmol.g}^{-1}$ doku değerine düştüğü belirlenmiştir ($P < 0.05$).

Çizelge 4.12. Buğday bitkisinde uygulamalara göre askorbat içeriğindeki değişimler

Uygulamalar	Askorbat (nmol.g^{-1} doku)
Kontrol	$0.680 \pm 0.0052e^*$
Soğuk	$0.743 \pm 0.0052c$
2 mM Azid	$0.811 \pm 0.0162b$
2 μM Antimisin A	$0.833 \pm 0.0046b$
5 mM Piruvat	$0.859 \pm 0.0052a$
4 mM SHAM	$0.714 \pm 0.0069d$

* Bir sütun içinde aynı harflerin bulunduğu gruplar arasındaki farklılıklar $P < 0.05$ önem seviyesine göre anlamsızdır.



Şekil 4.16. Azid, antimisin A, piruvat ve SHAM uygulamalarının buğday bitkisinde askorbat içeriği üzerine etkileri

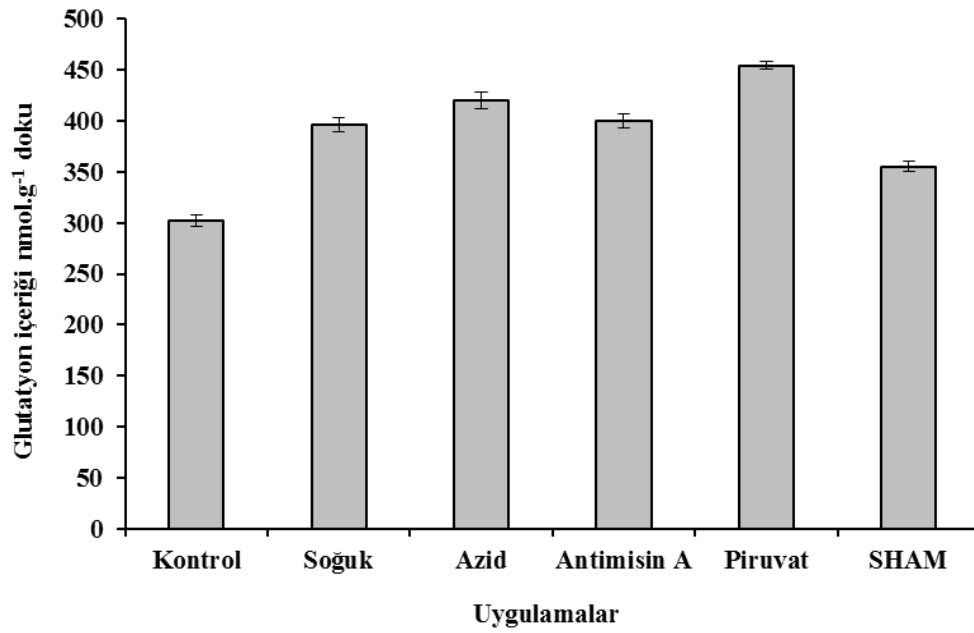
4.2.2. Glutasyon içeriği sonuçları

Glutasyon içeriğinde soğuk uygulaması ve diğer uygulamalar ciddi artışlara neden olmuşlardır. Soğuk grubuna göre ise 2 mM Azid uygulaması %31.1 artışa neden olmuştur. Bu uygulama ile soğuk uygulamasında 396 nmol.g⁻¹ doku olarak ölçülen glutasyon içeriğinin 420 nmol.g⁻¹ doku değerine yükselmesine neden olmuştur (Çizelge 4.13). 2 µM Antimisin A uygulaması ile soğuğa kıyasla istatistiki önem taşıyan bir artış belirlenmemiştir. 5 mM piruvat uygulamasıyla ise soğuk grubu bitkilere göre %14.6'lık bir artış kaydedilmiş ve glutasyon içeriği 454 nmol.g⁻¹ doku değerinde ölçülmüştür ($P<0.05$). Soğuk uygulamasına göre glutasyon içeriğini azaltan tek uygulama 4 mM SHAM uygulaması olmuştur. Glutasyon içeriği bu uygulama ile soğuk grubuna göre %10.4 oranında düşerek 355 nmol.g⁻¹ doku değerine gerilemiştir ($P<0.05$).

Çizelge 4.13. Nohut bitkisinde uygulamalara göre glutatyon içeriğindeki değişimler

Uygulamalar	Glutatyon (nmol.g ⁻¹ doku)
Kontrol	302±5.196e*
Soğuk	396±6.351c
2 mM Azid	420±8.083b
2 µM Antimisin A	400±6.928c
5 mM Piruvat	454±4.041a
4 mM SHAM	355±5.196d

* Bir sütun içinde aynı harflerin bulunduğu gruplar arasındaki farklılıklar $P < 0.05$ önem seviyesine göre anlamsızdır.

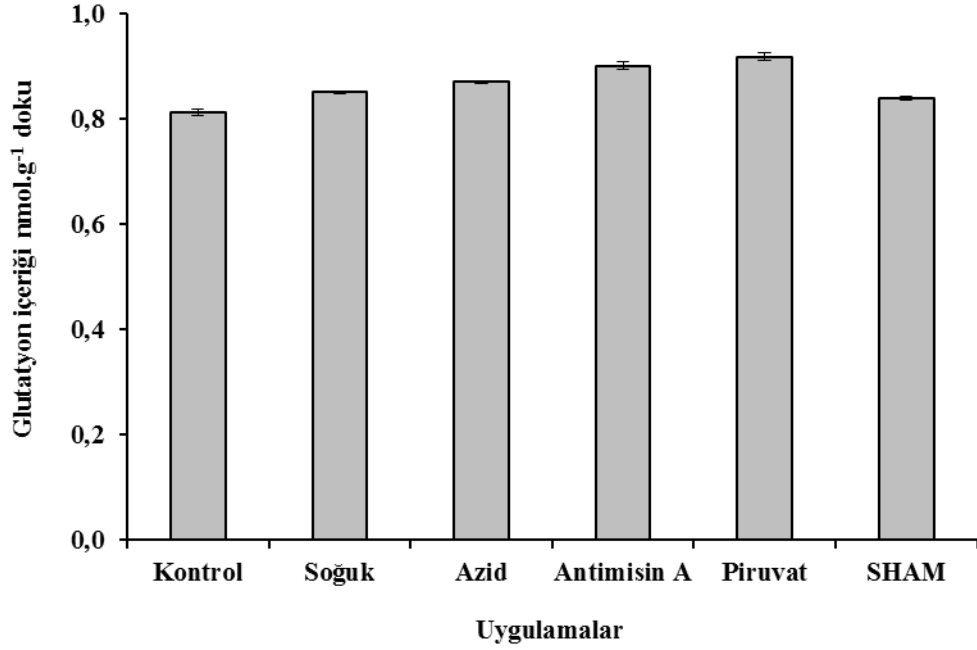
**Şekil 4.17.** Azid, antimisin A, piruvat ve SHAM uygulamalarının nohut bitkisinde glutatyon içeriği üzerine etkileri

Buğday bitkisinde de soğuk grubuna göre tüm uygulamalarla glutatyon içeriğinin önemli artış gösterdiği belirlenmiştir. Soğuk uygulamasında $0.850 \text{ nmol.g}^{-1}$ doku olarak belirlenen glutatyon miktarları 2 mM Azid, 2 μM Antimisin A ve 5 mM Piruvat uygulamalarıyla sırası ile %2.4, %6 ve %8 oranlarında artış göstermişlerdir (Çizelge 4.14). Bu uygulamalar sonucu glutatyon içerikleri 0.870, 0.901 ve 0.918 nmol.g^{-1} doku değerlerinde ölçülmüştür ($P < 0.05$). Soğuk uygulamasına kıyasla 4 mM SHAM uygulaması ile ise glutatyon miktarı azalmış ancak bu düşüş istatistiki olarak önemsiz olduğu saptanmıştır ($P > 0.05$).

Çizelge 4.14. Buğday bitkisinde uygulamalara göre glutatyon içeriğindeki değişimler

Uygulamalar	Glutatyon (nmol.g^{-1} doku)
Kontrol	$0.812 \pm 0.0069e^*$
Soğuk	$0.850 \pm 0.0029d$
2 mM Azid	$0.870 \pm 0.0029c$
2 μM Antimisin A	$0.901 \pm 0.0075b$
5 mM Piruvat	$0.918 \pm 0.0064a$
4 mM SHAM	$0.839 \pm 0.0035d$

* Bir sütun içinde aynı harflerin bulunduğu gruplar arasındaki farklılıklar $P < 0.05$ önem seviyesine göre anlamsızdır.



Şekil 4.18. Azid, antimisin A, piruvat ve SHAM uygulamalarının buğday bitkisinde glutasyon içeriği üzerine etkileri

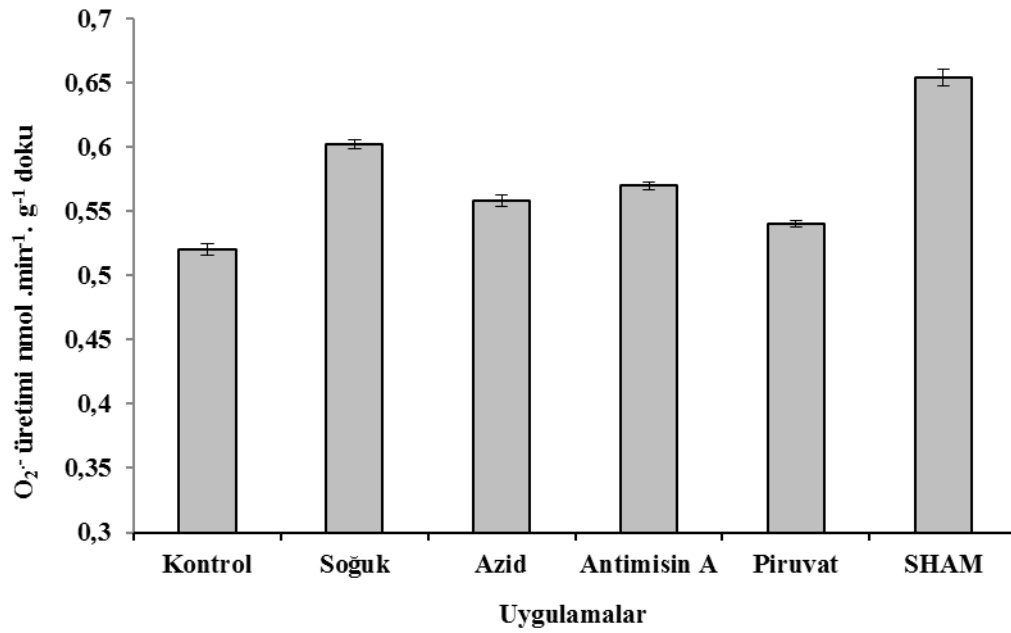
4.3. Süperoksit (O₂⁻) Üretimi Sonuçları

Nohutun yaprak dokusunda süperoksit anyonu üretimi soğuk uygulaması ile önemli derecede yükseldiği belirlendi ($P < 0.05$). Kontrol grubunda $0.52 \text{ nmol.min}^{-1}.\text{g}^{-1}$ doku olarak ölçülen süperoksit anyonu miktarı soğuk uygulaması ile %15.8 oranında artışla $0.602 \text{ nmol.g}^{-1}$ doku olarak belirlendi. Solunum yolundaki kompleks IV inhibitörü olan 2 mM azid uygulaması ile soğuk uygulamasına göre süperoksit içeriği %7.3 oranında azalmıştır. Bu uygulama sonucu süperoksit anyonu üretimi $0.558 \text{ nmol.min}^{-1}.\text{g}^{-1}$ doku olarak belirlenmiştir ($P < 0.05$). Kompleks III inhibitörü 2 μM antimisin A uygulaması ise süperoksit içeriğini daha da düşürmüştür. 2 μM antimisin A uygulaması sonucunda soğuk uygulamasına göre %5.3 düşüş saptanmış ve bu uygulama ile süperoksit miktarı $0.570 \text{ nmol.g}^{-1}$ doku değerinde olduğu tespit edilmiştir. Süperoksit içeriğini 5 mM piruvat uygulaması da soğuk uygulamasına göre %10.3 oranında düşürmüş ve $0.540 \text{ nmol.min}^{-1}.\text{g}^{-1}$ doku değerine geriletmiştir. AOX inhibitörü 4 mM SHAM uygulaması ise süperoksit içeriğini soğuk grubuna göre %8.6 gibi ciddi bir değerde artırarak $0.654 \text{ nmol.min}^{-1}.\text{g}^{-1}$ doku değerine ulaştırmıştır (Çizelge 4.15) ($P < 0.05$).

Çizelge 4.15. Nohut bitkisinde uygulamalara göre süperoksit (O_2^-) üretimi değişimi

Uygulamalar	O_2^- Üretimi ($nmol.min^{-1}.g^{-1}$ doku)
Kontrol	$0.520 \pm 0.005e^*$
Soğuk	$0.602 \pm 0.003b$
2 mM Azid	$0.558 \pm 0.005c$
2 μ M Antimisin A	$0.570 \pm 0.003c$
5 mM Piruvat	$0.540 \pm 0.002d$
4 mM SHAM	$0.654 \pm 0.007a$

* Bir sütun içinde aynı harflerin bulunduğu gruplar arasındaki farklılıklar $P < 0.05$ önem seviyesine göre anlamsızdır.

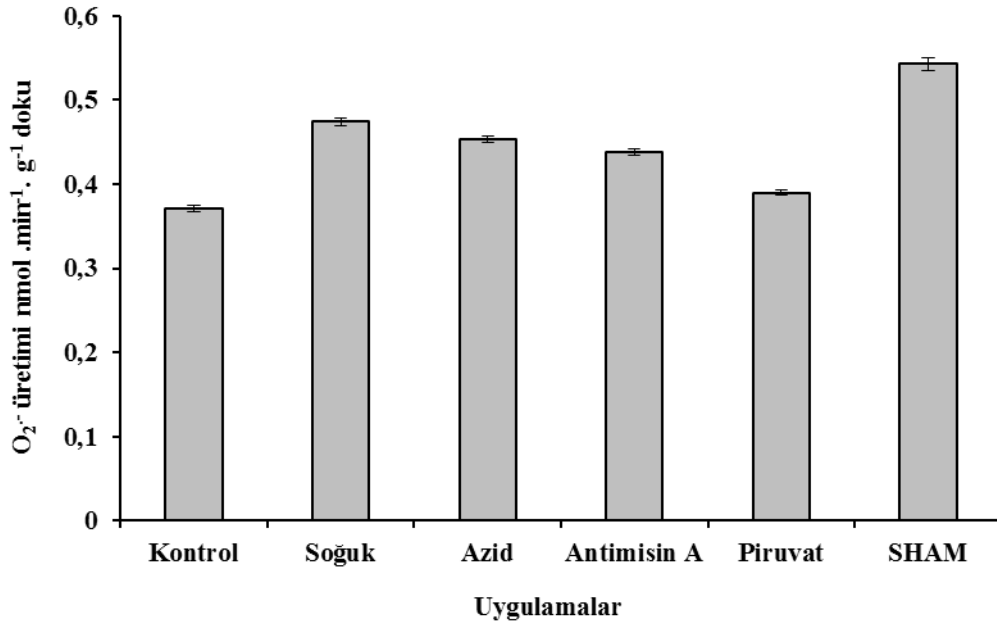
**Şekil 4.19.** Azid, antimisin A, piruvat ve SHAM uygulamalarının nohut bitkisinde O_2^- üretimi üzerine etkileri

Süperoksit içeriğinde buğdayda da nohutla benzer değişimler olduğu tespit edilmiştir. Kontrol grubunda $0.371 \text{ nmol.min}^{-1}.\text{g}^{-1}$ doku değerinde olan süperoksit anyonu üretimi soğuk uygulaması ile %27.8 artarak $0.474 \text{ nmol.min}^{-1}.\text{g}^{-1}$ doku değerine ulaşmıştır. Soğuk uygulamasına göre sitokrom yolu inhibitörlerinden 2 mM azid ve 2 μM antimisin A uygulamaları süperoksit içeriğinde sırasıyla %4.4 ve %7.6 düşüşe neden olmuşlar ve bu uygulamalar sonucunda süperoksit miktarları 4.53 ve $0.438 \text{ nmol.min}^{-1}.\text{g}^{-1}$ doku değerlerinde ölçülmüştür ($P < 0.05$). 5 mM piruvat uygulaması da O_2^- içeriğini soğuk uygulamasına göre %17.7 oranında düşürmüş ve O_2^- içeriği $0.390 \text{ nmol.min}^{-1}.\text{g}^{-1}$ doku değerlerine geriletmiştir. Solunum yolu inhibitörleri ve AOX aktivatörünün aksine AOX inhibitörü olduğu kabul gören 4 mM SHAM uygulaması ise yalnız soğuk uygulamasına göre O_2^- içeriğini %14.6 oranında artırarak $0.543 \text{ nmol.min}^{-1}.\text{g}^{-1}$ doku değerlerine yükseldiği saptanmıştır (Çizelge 4.16) ($P < 0.05$).

Çizelge 4.16. Buğday bitkisinde uygulamalara göre süperoksit (O_2^-) üretimi değişimi

Uygulamalar	O_2^- Üretimi ($\text{nmol.min}^{-1}.\text{g}^{-1}$ doku)
Kontrol	$0.371 \pm 0.0032f^*$
Soğuk	$0.474 \pm 0.0041b$
2 mM Azid	$0.453 \pm 0.0040c$
2 μM Antimisin A	$0.438 \pm 0.0040d$
5 mM Piruvat	$0.390 \pm 0.0024e$
4 mM SHAM	$0.543 \pm 0.0075a$

* Bir sütun içinde aynı harflerin bulunduğu gruplar arasındaki farklılıklar $P < 0.05$ önem seviyesine göre anlamsızdır.



Şekil 4.20. Azid, antimisin A, piruvat ve SHAM uygulamalarının buğday bitkisinde O₂⁻ üretimi üzerine etkileri

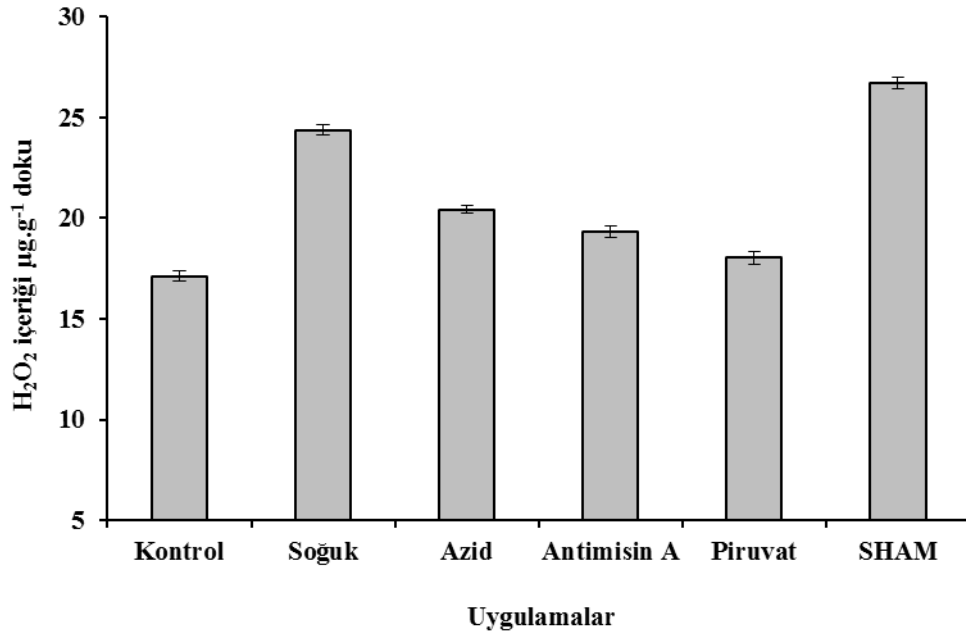
4.4. H₂O₂ İçeriği Sonuçları

Nohutun kontrol grubunda 17.13 µg.g⁻¹ doku değerinde ölçülen H₂O₂ içeriğini soğuk uygulaması ile %42.3 oranında artarak 24.37 µg.g⁻¹ doku değerine ulaştığı saptandı (Çizelge 4.17). Soğuk uygulamasına göre azid, antimisin A ve piruvat uygulamalarının hepsi H₂O₂ içeriğini önemli oranlarda azalttıkları belirlendi. Soğuk uygulamasına göre bu uygulamalarda kaydedilen değerler sırasıyla %16.1, %20.7 ve %26 oranında daha düşük olarak 20.44, 19.33 ve 18.03 µg.g⁻¹ doku değerlerinde olduğu belirlendi ($P < 0.05$). AOX inhibitörü SHAM uygulamasında ise soğuğa göre önemli değerde artış kaydedildi. Bu uygulama sonucunda H₂O₂ içeriği soğuğa göre %9.7 artarak 26.74 µg.g⁻¹ doku değerlerine ulaştığı belirlenmiştir ($P < 0.05$).

Çizelge 4.17. Nohut bitkisinde uygulamalara göre H₂O₂ içeriğinin değişimi

Uygulamalar	H ₂ O ₂ İçeriği (µg.g ⁻¹ doku)
Kontrol	17.13±0.257f*
Soğuk	24.37±0.260b
2 mM Azid	20.44±0.173c
2 µM Antimisin A	19.33±0.277d
5 mM Piruvat	18.03±0.300e
4 mM SHAM	26.74±0.283a

* Bir sütun içinde aynı harflerin bulunduğu gruplar arasındaki farklılıklar $P < 0.05$ önem seviyesine göre anlamsızdır.

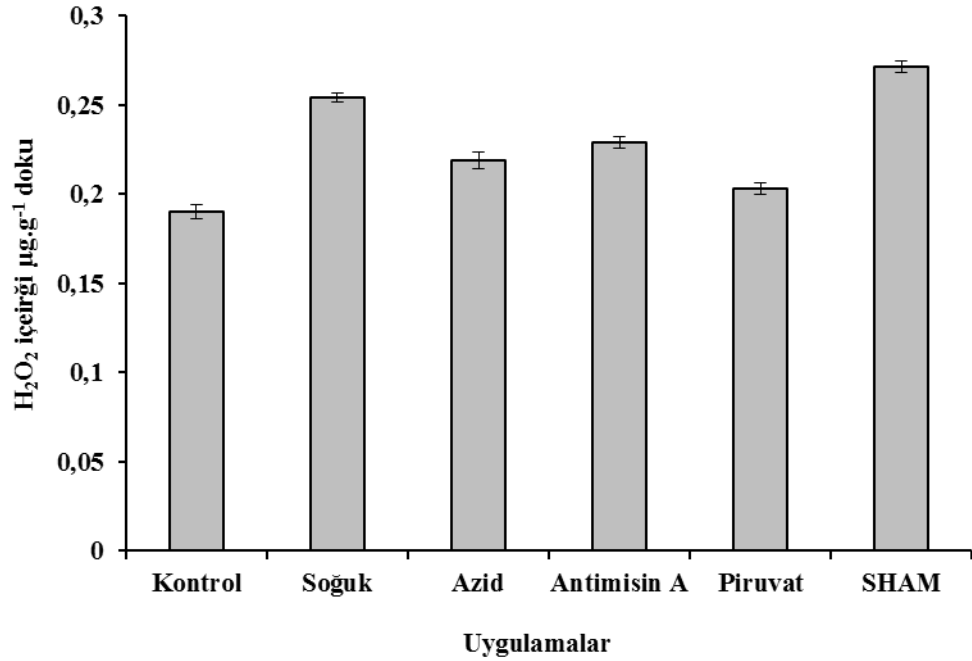
**Şekil 4.21.** Azid, antimisin A, piruvat ve SHAM uygulamalarının nohut bitkisinde H₂O₂ içeriği üzerine etkileri

Buğday bitkisinde de soğuk uygulaması H_2O_2 içeriğini artırmıştır. Kontrol bitkisinde H_2O_2 içeriği $0.190 \mu\text{g.g}^{-1}$ doku değerinde ölçülmesine rağmen soğuk uygulaması bu değeri %33.7 oranında artırmış ve $0.254 \mu\text{g.g}^{-1}$ doku değerine ulaştırmıştır (Çizelge 4.18). Soğuk uygulamasına göre 2mM azid, 2 μM antimisin A ve 5 mM piruvat uygulamaları H_2O_2 içeriğinde sırasıyla %13.8, %9.8 ve %20.1 oranlarında düşüşe neden olmuşlardır. Bu uygulamalarla H_2O_2 içeriği 0.219, 0.229 ve 0.203 $\mu\text{g.g}^{-1}$ doku değerlerinde ölçülmüştür. 4 mM SHAM uygulaması sonucunda ise H_2O_2 içeriği soğuk uygulamasına göre %6.7 oranında bir artışa neden olmuş ve bu uygulama H_2O_2 içeriğinin $0.271 \mu\text{g.g}^{-1}$ doku değerine ulaşmasına neden olmuştur ($P < 0.05$).

Çizelge 4.18. Buğday bitkisinde uygulamalara göre H_2O_2 içeriğinin değişimi

Uygulamalar	H_2O_2 İçeriği ($\mu\text{g.g}^{-1}$ doku)
Kontrol	$0.190 \pm 0.0040e^*$
Soğuk	$0.254 \pm 0.0023b$
2 mM Azid	$0.219 \pm 0.0046c$
2 μM Antimisin A	$0.229 \pm 0.0035c$
5 mM Piruvat	$0.203 \pm 0.0035d$
4 mM SHAM	$0.271 \pm 0.0032a$

* Bir sütun içinde aynı harflerin bulunduğu gruplar arasındaki farklılıklar $P < 0.05$ önem seviyesine göre anlamsızdır.



Şekil 4.22. Azid, antimisin A, piruvat ve SHAM uygulamalarının buğday bitkisinde H₂O₂ içeriği üzerine etkileri

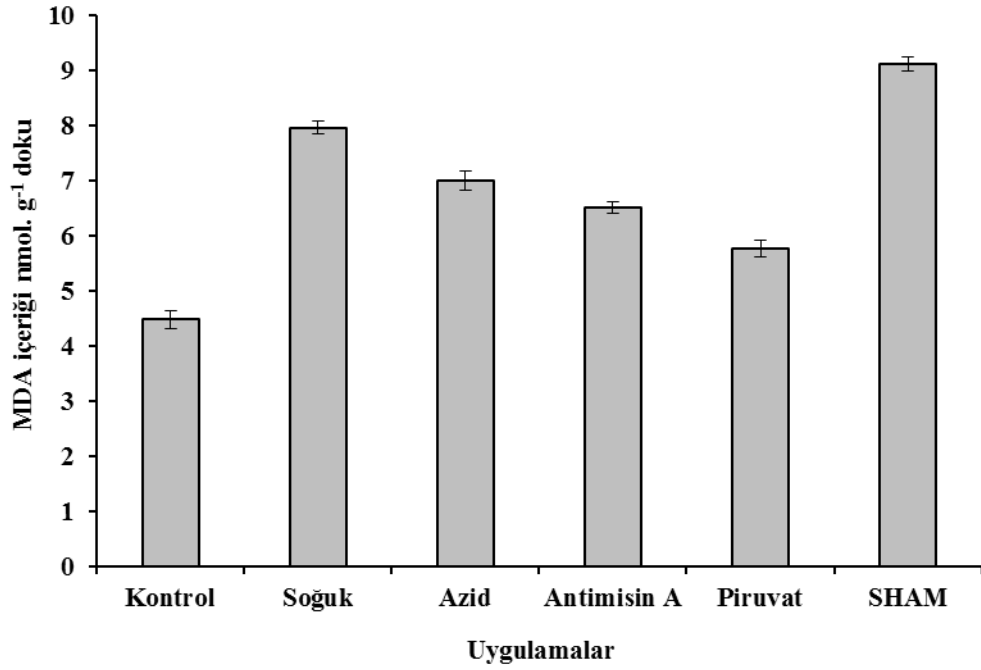
4.5. Lipid Peroksidasyon Seviyesi (MDA içeriği) Sonuçları

Soğuk uygulamasının nohut bitkisinin yapraklarındaki MDA içeriğini kontrol bitkisine oranla önemli derecede artırdığı belirlendi. Kontrol bitkisinde MDA içeriği 4.475 nmol.g⁻¹ doku olarak belirlenirken soğuk uygulaması bu değeri %77.8 artırarak 7.956 nmol.g⁻¹ doku seviyesine çıkardı ($P<0.05$). Soğuk uygulamasına kıyasla, 2 mM azid, 2 µM antimisin A ve 5 mM piruvat uygulamalarının MDA içeriğinde önemli azalmalara neden oldukları saptanmıştır. Soğuk uygulamasına göre MDA içeriğini 2 mM azid %12.2 azaltarak 6.986, 2 µM antimisin A %18.3 azaltarak 6.501 ve 5 mM piruvat %27.7 azaltarak 5.756 nmol.g⁻¹ doku düzeylerine düşürdükleri belirlenmiştir ($P<0.05$). AOX inhibitörü olan 4 mM SHAM uygulaması ise soğuk uygulamasına kıyasla MDA içeriğini %14.7 artırarak 9.122 nmol.g⁻¹ doku seviyesine yükseltmiştir (Çizelge 4.19)($P<0.05$).

Çizelge 4.19. Nohut bitkisinde uygulamalara göre MDA içeriğinin değişimi

Uygulamalar	MDA İçeriği (nmol.g ⁻¹ doku)
Kontrol	4.475±0.162f*
Soğuk	7.956±0.121b
2 mM Azid	6.986±0.173c
2 µM Antimisin A	6.501±0.104d
5 mM Piruvat	5.756±0.145e
4 mM SHAM	9.122±0.127a

* Bir sütun içinde aynı harflerin bulunduğu gruplar arasındaki farklılıklar $P < 0.05$ önem seviyesine göre anlamsızdır.

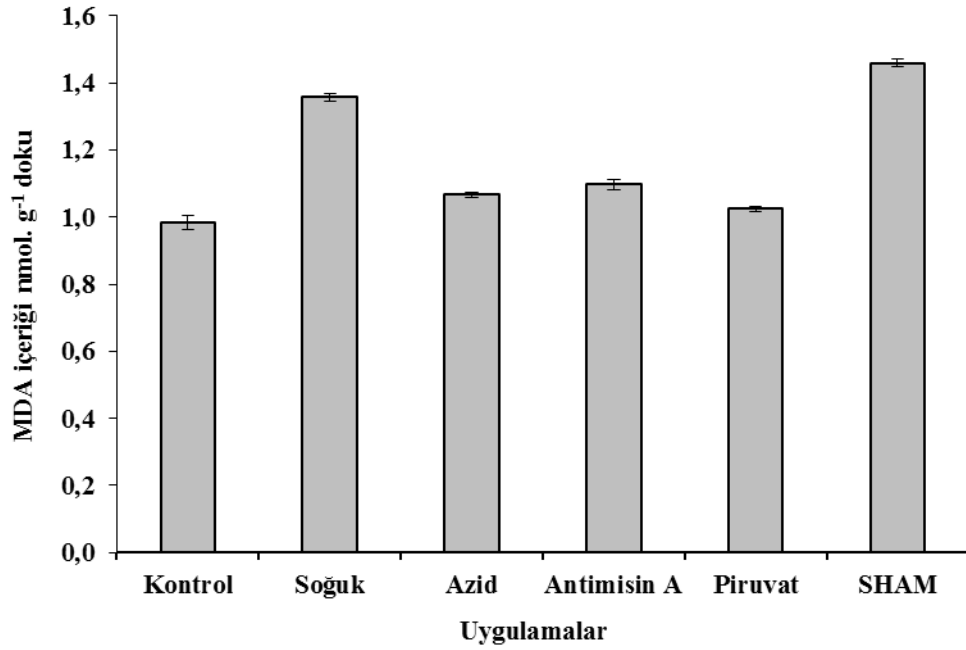
**Şekil 4.23.** Azid, antimisin A, piruvat ve SHAM uygulamalarının nohut bitkisinde MDA içeriği üzerine etkileri

Soğuk uygulamasının buğday bitkisinin kontrol grubuna göre MDA içeriğinde önemli artışa neden olduğu belirlendi. MDA içeriği kontrol bitki yapraklarında $0.984 \text{ nmol.g}^{-1}$ doku değerinde ölçüldü. Soğuk uygulaması ise MDA içeriğini kontrol grubuna göre %37.9 oranında artırarak $1.357 \text{ nmol.g}^{-1}$ doku değerine yükselttiği saptandı. Sitokrom yolu inhibitörlerinden 2 mM azid, 2 μM antimisin A uygulamalarının ise soğuk uygulamasına göre MDA içeriğini önemli derecede düşürdükleri tespit edildi. Soğuk uygulamasına göre 2 mM azid uygulaması MDA içeriğini %21.4 azaltırken 2 μM antimisin A uygulaması ise %19.1 azalttığı belirlendi. Sırasıyla 2 mM azid ve 2 μM antimisin A uygulamaları sonucunda MDA içerikleri 1.067 ve $1.098 \text{ nmol.g}^{-1}$ doku olarak ölçülmüştür. Bir AOX aktivatörü olan 5 mM piruvat uygulamasında ise tüm gruplara göre MDA düzeyinin en düşük değeri elde edilmiştir. Soğuk uygulamasına göre 5mM piruvat uygulaması MDA içeriğini %24.5 azaltıp $1.025 \text{ nmol.g}^{-1}$ doku değerine geriletmiştir. Soğuk uygulamasına kıyasla 4 mM SHAM uygulaması ise MDA içeriğini %7.6 artırmış ve bu uygulama sonucunda MDA içeriği $1.460 \text{ nmol.g}^{-1}$ doku değerinde olduğu belirlenmiştir ($P < 0.05$). MDA seviyesinin en yüksek değeri 4 mM SHAM uygulaması sonucu elde edilmiştir (Çizelge 4.20), (Şekil 4.26).

Çizelge 4.20. Buğday bitkisinde uygulamalara göre MDA içeriğinin değişimi

Uygulamalar	MDA İçeriği (nmol.g^{-1} doku)
Kontrol	$0.984 \pm 0.0214e^*$
Soğuk	$1.357 \pm 0.0098b$
2 mM Azid	$1.067 \pm 0.0069c$
2 μM Antimisin A	$1.098 \pm 0.0150c$
5 mM Piruvat	$1.025 \pm 0.0081d$
4 mM SHAM	$1.460 \pm 0.0115a$

* Bir sütun içinde aynı harflerin bulunduğu gruplar arasındaki farklılıklar $P < 0.05$ önem seviyesine göre anlamsızdır.



Şekil 4.24. Azid, antimisin A, piruvat ve SHAM uygulamalarının buğday bitkisinde MDA içeriği üzerine etkileri

4.6. AOX Aktivitesi ve AOX Proteinin İfade Düzeyi Sonuçları (Western Blot)

Antioksidan sistem, radikal miktarları ve lipid peroksidasyon düzeylerinden elde edilen tüm veriler değerlendirilerek araştırmanın bu kısmına sitokrom yolu inhibitörlerinden 2 μ M Antimisin A, AOX aktivatörü 5 mM Piruvat ve bir AOX inhibitörü olan 4 mM SHAM uygulamalarıyla ile devam edilmesine karar verilmiştir.

Sitokrom yolu ile birlikte alternatif solunum yolunda tüketilen oksijen düzeyi hücrel solunum değeridir. Hücrel solunum değeri ve AOX aktivitesi yaprak dokusundan izole edilmiş mitokondrilerde oksijen tüketimin belirlenmesi yöntemiyle ölçülmüştür. AOX proteinin ifade düzeyi ise izole edilen mitokondrilerde western blot tekniği ile yapılan immunolojik saptamada belirlenmiştir.

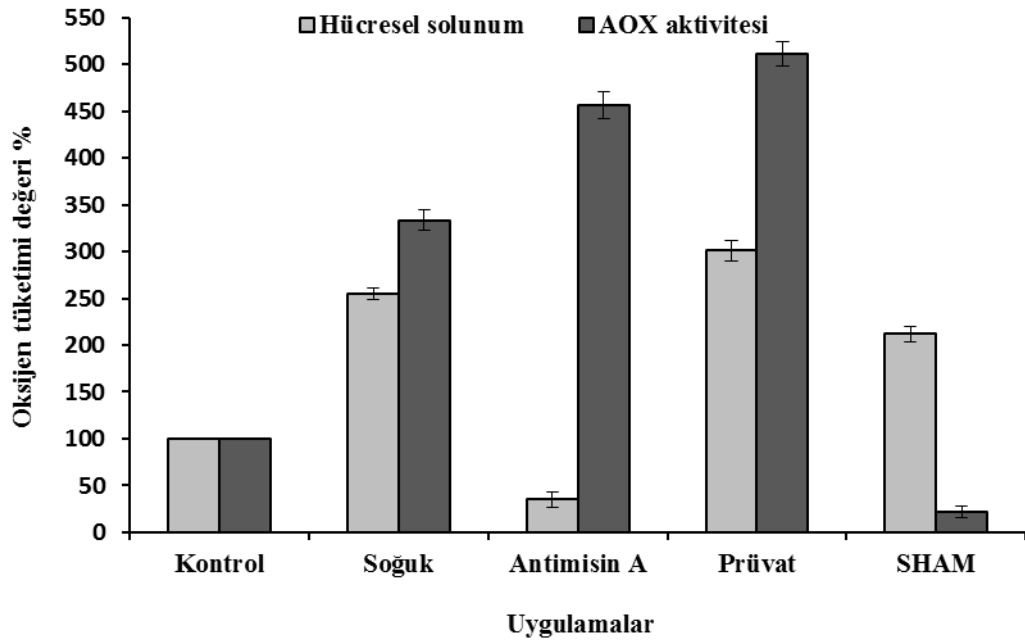
Nohut bitkisinin kontrol grubundaki hücrel solunum değeri ve AOX aktivitesi %100 olarak kabul edilmiştir. Kontrol bitkilerine göre soğuk uygulaması hem hücrel solunum değerini hemde AOX aktivitesini ciddi anlamda artırmıştır. Soğuk uygulaması

ile AOX aktivitesi yaklaşık üç kat artmıştır. Sitokrom yolunda Kompleks III inhibitörü olan 2 μ M Antimisin A uygulaması ise soğuk uygulamasına göre hücrel solunum değerini kontrol bitkisinden elde edilen değer %35'ine yakın seviyelere geriletirken AOX aktivitesini önemli şekilde artırmıştır. Hem hücrel solunum değerinin hem de AOX aktivitesinin en yüksek değeri ise bir AOX aktivatörü olan 5mM Piruvat uygulaması sonucu ölçülmüştür. AOX inhibitörü 4 mM SHAM uygulaması ile ise AOX aktivitesi kontrol değerinin dahi çok altına gerilemiştir (Çizelge 4.21) ($P < 0.05$).

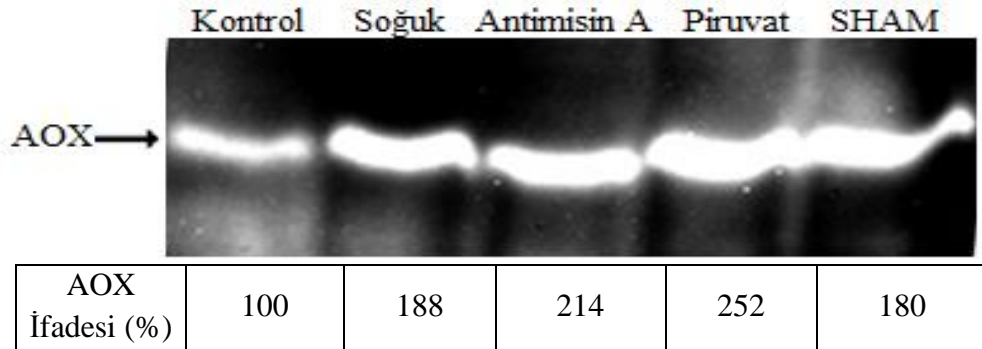
Çizelge 4.21. Nohut bitkisinde uygulamalara göre hücrel solunum değeri ve AOX aktivitesi

Uygulamalar	Hücrel solunum değeri (%)	AOX aktivitesi (%)
Kontrol	100 d*	100d*
Soğuk	255±6.351b	333±10.970c
2 μ M Antimisin A	35±8.083e	456±14.434b
5 mM Piruvat	301±10.970a	511±12.702a
4 mM SHAM	212±8.083c	22±6.351e

* Bir sütun içinde aynı harflerin bulunduğu gruplar arasındaki farklılıklar $P < 0.05$ önem seviyesine göre anlamsızdır.



Şekil 4.25. Nohut bitkisinde azid, antimisin A, piruvat ve SHAM uygulamalarıyla hücresel solunum değeri ve AOX aktivitesinin değişimi (%)



Şekil 4.26. Azid, antimisin A, piruvat ve SHAM uygulamalarıyla nohut bitkisinde AOX proteini translasyon düzeyi değişimi

Nohut bitkisinin kontrol grubuna göre soğuk ve diğer tüm uygulamalarda AOX ifadesinin arttığı gözle görülmektedir. AOX ifadesi soğuk uygulamasına kıyasla 2 μ M Antimisin A uygulaması önemli derecede artarken 5 mM piruvat uygulaması ile ise en yüksek artış gerçekleşmiştir. 4 mM SHAM uygulaması AOX ifadesinin yalnız soğuk uygulamasından hafif düşük düzeyde olmasına neden olmuştur. Ancak bu düşüş AOX

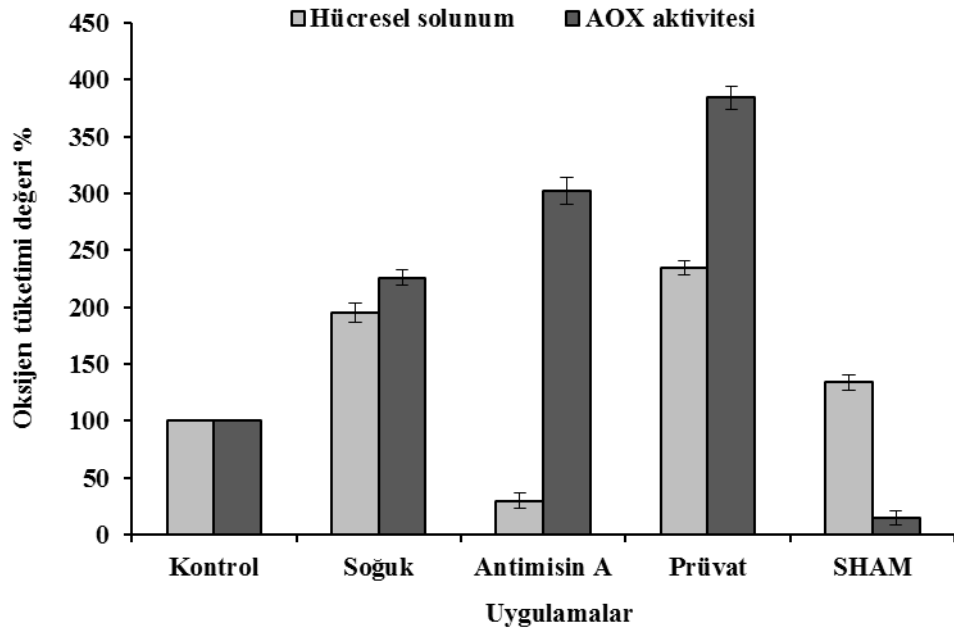
aktivite düşüğüyle paralel düzeyde gerçekleşmemiştir. Çünkü 4 mM SHAM uygulamasının AOX aktivite değeri çok düşük seviyelere gerilemesine neden olmuş (Şekil 4.25) fakat AOX ifadesini bu oranda azaltmadığı belirlenmiştir (Şekil 4.26).

Buğday bitkisinde de nohut bitkisindeki sonuçlara paralel bir şekilde soğuk uygulaması hem hücrel solunum değeri hem de AOX aktivitesini önemli oranda artırmıştır. Buğday bitkisinin kontrol grubuna göre soğuk uygulaması hücrel solunum değeri yaklaşık iki katına çıkarmıştır. Soğuk uygulaması ile AOX aktivitesi ise %126 oranında artmıştır. 2 µM Antimisin A uygulaması ise hücrel solunumu kontrol bitkisinin dahi çok altındaki bir değere düşürürken AOX aktivitesi soğuk uygulamasından elde edilen değerden yüksek seviyelere ulaştırmıştır. Soğuk uygulamasına göre 5 mM piruvat uygulaması hücrel solunum değeri artırdığı saptanmıştır. Bu uygulamanın AOX aktivitesinin de en yüksek değere ulaşmasına neden olduğu saptanmıştır. 4 mM SHAM uygulaması hem hücrel solunum değeri hem de AOX aktivitesinin düşmesine neden olmuştur. Bu uygulama sonucu AOX aktivitesi kontrol bitkisinden elde edilen sonucun dahi çok altında olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.22) ($P < 0.05$).

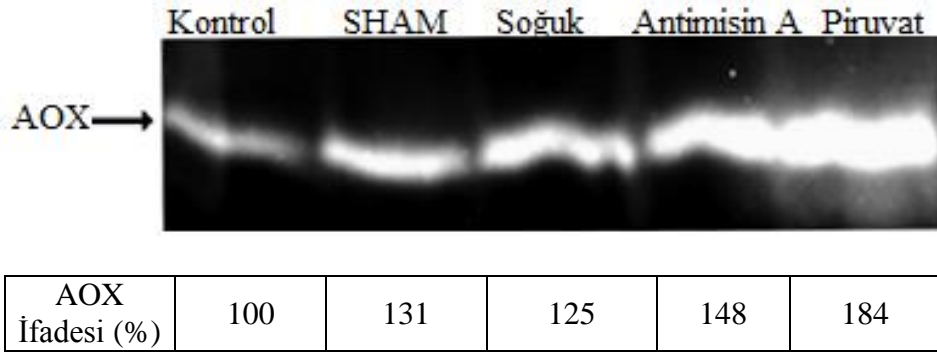
Çizelge 4.22. Buğday bitkisinde uygulamalara göre hücrel solunum değeri ve AOX aktivitesi

Uygulamalar	Hücrel solunum değeri (%)	AOX aktivitesi (%)
Kontrol	100d*	100d*
Soğuk	195±8.660b	226±6.928c
2 µM Antimisin A	30±6.928e	302±11.547b
5 mM Piruvat	235±6.351a	384±9.815a
4 mM SHAM	134±6.928c	15±5.7749e

* Bir sütun içinde aynı harflerin bulunduğu gruplar arasındaki farklılıklar $P < 0.05$ önem seviyesine göre anlamsızdır.



Şekil 4.27. Buğday bitkisinde azid, antimisin A, piruvat ve SHAM uygulamalarıyla hücre solunum değeri ve AOX aktivitesinin değışımi (%)



Şekil 4.28. Azid, antimisin A, piruvat ve SHAM uygulamalarıyla buğday bitkisinde AOX proteini translasyon düzeyi değışımi

Buğday mitokondrilerinde soğuk uygulamasıyla AOX proteini düzeyi artığı belirgin olarak görülebilmektedir. Soğuk uygulamasına kıyasla sitokrom yolunun inhibe olmasına neden olan 2 μ M Antimisin A uygulaması ve AOX aktivatörü 5 mM Piruvat uygulamaları AOX proteinin ifade düzeyini artırmışlardır. Bu uygulamalarda AOX aktivitesinin de artış gösterdiği belirlenmiştir. AOX ifadesi 4 mM SHAM uygulaması ile soğuk uygulamasına yakın düzeyde olmuştur. Bunun yanında AOX inhibitörü 4 mM

SHAM uygulaması ile AOX aktivitesi yok denecek düzeyde olmasına (Şekil 4.27) rağmen AOX ifadesi, AOX aktivite değeri ile aynı oranda azalmadığı belirlenmiştir (Şekil 4.28).

5. SONUÇ ve TARTIŞMA

Mevcut çalışmada soğuğa tolerans yetenekleri farklı olan buğday (*Triticum aestivum* cv. Müfitbey) ve nohut (*Cicer arietinum* cv. Yaşa-05) bitkileri kullanılmıştır. Dünyada da en fazla üretilen tahıl bitkilerinden biri olan buğday, soğuğa tolerans yeteneği yüksek olan bir bitkidir. Türkiye İstatistik Kurumu'nun (TÜİK) 2011 yılı verilerine göre Türkiye'deki hububat üretiminin yarısından fazlasını buğday oluştur (Topal 1993). Buğday insanların temel gıda ihtiyaçlarından un, irmik ve makarnanın ham maddesidir (Sramkova *et al.* 2009). Buğday %60-75 nisasta, %10-18 protein, %1.5 lif ve %0.5 oranında ise vitamin içerir (Belderok *et al.* 2000; Sramkova *et al.* 2009).

Çalışmamızda kullandığımız diğer bir bitki olan nohut ise üretim ve ekim yönüyle baklagiller arasında ilk sıralarda yer alan ve soğuğa hassas olan bir bitkidir. TÜİK 2011 yılı verilerine göre Türkiye'deki baklagil üretiminin yaklaşık yarısını nohut oluşturur. Köklerinde azotu bağlayan bakteriler içerdiğinden dolayı, hububatlar ile münavebeli ekimleri tarım açısından oldukça önemlidir. Bunun yanı sıra, besin değeri yüksek olan nohut yaklaşık %41-47 oranında karbohidrat, 22-23 oranında protein (Rincón *et al.* 1998) ile B vitamini ve çeşitli mineraller de içerir (Alajaji and El-Adawy 2006). Ayrıca nohutun geçit formları ile yabancı formları arasındaki formları hayvan yemi olarak da kullanılmaktadır (Erdoğan 1997; Erdal 2010).

Ekonomik öneme sahip olan bitkiler ani sıcaklık düşüşlerinden ciddi anlamda zarar görürler. Bu ani düşüşlerinin bitkilere verdiği zararlar sonucu önemli oranlarda ürün kayıpları meydana gelir. Mevcut çalışmada, ekonomik değeri yüksek olan nohut ve buğday bitkilerinin düşük sıcaklıklara tolerans yeteneğini artırmak ve böylece ani değişimlerle ortaya çıkabilecek ürün kayıplarının önüne geçmek hedeflenmiştir. Bu doğrultuda bitki solunum zincirinde mevcut olan ve ROT oluşumunun indirgenmesi ile içsel ısı artışının oluşmasına sebep olan AOX enziminin aktifleştirilmesi hedeflenmiştir (Purvis 1997; Wagner and Moore 1997). Bu amaç doğrultusunda düşük sıcaklıklara maruz bırakılan bitkilere solunum inhibitörleri olan azid ve antimisin A ile bir AOX

aktivatörü olan piruvat uygulanmış ve bitkilerde antioksidan sistem ve ROT seviyesindeki değişimler, membran hasarları, hücresel ve alternatif solunum değerleri gibi çeşitli fizyolojik ve biyokimyasal parametrelerin yanı sıra izoenzim değişimleri ile AOX'un miktarındaki değişimler gibi moleküler düzeyde değişimler de belirlenmiştir. Sonuçları değerlendirebilmek ve elde edilen bulguları doğru bir şekilde yorumlayabilmek için bitkilere bir AOX inhibitörü olan SHAM uygulanması da yapılmıştır. Çalışmamızın esasını oluşturan eksojen olarak solunum inhibitörlerinin uygulanması ile soğuğa direnç kazandırma ile ilgili literatürde herhangi bir bulgu olmadığı için çalışmamız bu yönüyle orijinal ve bir ilk olma özelliğindedir.

5.1. Azid, Antimisin A, Piruvat ve SHAM Uygulamalarının Antioksidan Sistem Üzerine Etkileri

Antioksidan sistemler ROT'ların zararlı etkilerine karşı bitkinin savunma mekanizması olarak kabul edilirler. Bu sistemde yer alan enzimatik antioksidanlardan SOD, POD, CAT, APX ve GR gibi enzimler ile enzimatik olmayan (non-enzimatik) antioksidanlardan glutatyon ve askorbik asit gibi maddeler oksidatif strese karşı koymada etkin bir mekanizma olarak işlev görürler ve oluşabilecek stres şartlarında daha fazla aktifleşirler (Chen and Li 2002; Javadian 2010; Erdal 2010). Bitkilerin olumsuz çevre şartlarına maruz kalması sonucunda ROT'ların miktarında meydana gelen artışa bağlı olarak enzimatik ve non-enzimatik antioksidan sistem aktifleşmekte, bu sayede bitkinin olumsuz çevre koşullarına uyum sağlamasına ve direncinin artmasına yardımcı olabilmektedir. Hücredeki proteinler, nükleik asitler ve membran lipidlerinde ciddi zararlar meydana getirdikleri için, ROT'lar soğuk stresinin neden olduğu zararların başlıca sorumlusu olarak kabul edilmektedir (Wiseand Naylor 1987; Rice-Evans *et al.* 1991; Hodgson and Raison 1991; Okuda *et al.* 1991; Prasad *et al.* 1994; Saruyama and Tanida 1995). Antioksidan sistem ise ROT'ları detoksifiye ederek olası zararları önlemeye çalışır. Bu sistemde yer alan enzimlerden olan ve bitki savunma hattının ilk enzimi olan SOD, süperoksit radikalini O_2 ve H_2O_2 'ye dönüştür. Oluşan H_2O_2 ise hidroksil radikalinin öncülü olduğundan diğer antioksidan enzimler (CAT, POD ve APX) tarafından O_2 veya H_2O 'ya dönüştürülerek etkisiz hale getirilir

(Bergmeyer and Grabl 1983; Asada 1992b; Scandalios 1990). H_2O_2 'nin radikal özelliğinin ortadan kaldırılmasında görev alan diğer bir sistem ise askorbat-glutasyon döngüsüdür. Bu sistemde APX'e ek olarak GR enzimi ile non-enzimatik antioksidanlar olan askorbat ve glutasyon da yer alır (Hossain *et al.* 1984; Polle *et al.* 1990; Bowler *et al.* 1992; Saruyama and Tanida 1995).

Literatürde düşük sıcaklık stresine maruz kalan bitkilerin antioksidan enzim aktivitelerindeki değişimler üzerine birçok çalışma bulunmaktadır. Ancak soğuk stresine maruz kalan bitkilerde solunum inhibitörleri ile AOX aktivatörlerinin antioksidan sistem, bitki direnci ve alternatif solunum yolu üzerine etkisi ile ilgili herhangi bir çalışma mevcut değildir.

Literatürde soğuk stresinin nohut ve buğday bitkilerinin çeşitli fizyolojik ve biyokimyasal parametreleri üzerine etkileri ile çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalarda soğuk stresinin neden olduğu hasarı yatıştırmak için bitkilere çeşitli kimyasal maddeler ve bitki büyüme regülatörleri eksojen olarak uygulanmış ve bu maddelerin olası etki mekanizmaları belirlenmeye çalışılmıştır. Bu çalışmalardan elde edilen sonuçlar göstermektedir ki soğuk stresine maruz kalan nohut bitkilerinde SOD ve CAT aktiviteleri önemli derecede artmış olmasına rağmen, POD aktivitelerinde önemli düşüşler meydana gelmiştir (Erdal 2012). SOD ve CAT enzimlerine paralel olarak APX ve GR enzimlerinin aktivitelerinin de soğuk stresine cevap olarak önemli oranda arttığı belirlenmiştir (Turan and Ekmekçi 2011). Benzer şekilde buğday bitkisi de soğuğa maruz bırakıldığında SOD ve CAT enzim aktivitelerinin arttığı oysa POD aktivitesinin önemli oranda azaldığı rapor edilmiştir (Scebba *et al.* 1999). Esim *et al.* (2012) tarafından yapılan çalışmada da buğday bitkisi soğuk stresine maruz bırakılması sonucunda antioksidan enzim aktivitelerinin arttığı saptanmıştır. Farklı bir çalışmada ise buğday bitkisinin iki farklı kültüvarı düşük sıcaklıklara maruz bırakılmış ve her iki varyetenin de CAT ve GR aktivitelerinde ciddi artışların olduğu belirlenmiştir (Keles and Oncel 2002). Soğuk stresine nohut ve buğday bitkilerinden başka bitkilerinde cevapları araştırılmış, yapılan çalışmalarda paralel sonuçlar elde edilmiştir. Örneğin, kışlık çavdar bitkisinin 4°C sıcaklığa maruz bırakılması sonucunda SOD ve GR enzim

aktivitelerinde artışların olduğu saptanmıştır (Streb and Shang 1999; Keles and Oncel 2002). Soğuk stresine maruz bırakılan mısır bitkilerinde de benzer sonuçlar elde edilmiş ve SOD, POD, APX ve GR aktivitelerinde önemli artışlar meydana gelmişken, POD aktivitesinde önemli düşüşler belirlenmiştir. Mevcut çalışmadan elde edilen bulgularda bu raporlarla uyumluydu. Hem nohut hem de buğday bitkilerinde soğuk stresi antioksidan enzimlerin aktivitelerini önemli oranda artırırken, POD aktivitesinde belirgin düşüşler gözlemlendi. POD enzim aktivitesindeki azalma, soğuk stresi şartlarında POD enzim aktivitesini kontrol eden mekanizmaların daha fazla olumsuz etkilenmesiyle bu enzimin aktivitesinin düşmesine yol açmasına ya da kuvvetle muhtemeldir ki POD ile benzer işlev gören CAT, APX ve askorbat-glutasyon çemberinin çok fazla aktifleştirilmesi nedeniyle POD'un aktivitesinin yükselmesine ihtiyaç duyulmamış olabilir. Bu varsayım, Scebba *et al.* (1999) tarafından da desteklenmektedir. Araştırmacılar bu düşüşü SOD ve CAT enzimlerinin aktivitelerindeki artışın zaten soğuğa uyumu tetiklendiğini, bu nedenle POD aktivitesinin artmasına ise ihtiyaç kalmadığı şeklinde yorumlamışlardır. Soğuk stresine maruz kalan bitkilerde meydana gelen SOD ve CAT aktivitelerindeki artışlar ile ROT'lardaki artışların paralel olduğu belirlenmiştir. Mevcut araştırmadan elde edilen bulgularda literatürde bildirilenlerle paraleldi.

Soğuk stresine dirençte AOX'un etkili olduğu birçok çalışma ile bildirilmiştir. Azid, antimisin A ve piruvatın AOX enzimi üzerine aktive edici etkisinin yanı sıra, antioksidan sistemi üzerine de önemli uyarıcı etkilere sahip olduğu söylenebilir. Eksojen olarak uygulanan solunum inhibitörleri olan azid ve antimisin A ile AOX aktivatörü olan piruvat, soğuk grubuna oranla SOD, POD ve CAT enzimlerinin aktivitelerini önemli oranda artırmıştır. Solunum inhibitörlerinin de AOX aktivatörü olarak iş gördükleri dikkate alındığında, her üç maddenin de uygulanmasının hem AOX enzimini aktifleştirerek ROT oluşumunu azalttığı, hem de azalan ROT oluşumuna paralel olarak antioksidan sistemi daha da aktifleştirdiği söylenebilir. Bu aktifleştirme aktifleşen AOX enziminin başlatmış olabileceği sinyal etkisine bağlanabilir. Çünkü AOX aktivitesindeki artışlar süperoksit radikal oluşumunu azaltacağı için, dolaylı olarak H₂O₂ miktarında azalmasına sebep olacaktır. Son zamanlarda yapılan

çalışmalar ortaya çıkarmıştır ki, H_2O_2 sinyal rolüne sahip olan bir moleküldür. Bu molekül düşük konsantrasyonlarda antioksidan sistemi uyararak bitki savunmasını artırmaktadır (Hung *et al.*2005; Zhang *et al.* 2011). Bu bilgiler ışığında söylenebilir ki, solunum inhibitörlerinin sebep olduğu yüksek AOX aktivitesi, H_2O_2 'nin sinyal rolünü etkinleştirerek antioksidan enzim aktivitelerini artırmış olabilir.

Diğer taraftan AOX inhibitörü olan SHAM uygulaması ile SOD aktivitesinde tek başına soğuk stresinin neden olduğundan daha büyük bir artış meydana gelmiştir. Bu durum göstermektedir ki, AOX'un inhibisyonu ile süperoksit oluşumu önemli oranda artmış, bu artışa paralel olarak bitki SOD aktivitesini de önemli oranda artırmıştır. Çünkü SOD enzimi süperoksiti parçalayan enzim olup, aynı zamanda bitki savunma sisteminin de ilk hattını oluşturmaktadır. SOD enziminin aksine, SHAM uygulaması POD ve CAT aktivitelerinde yalnız soğuk uygulamasına göre büyük düşüslere sebep olmuştur. Bu bulgu, SHAM uygulanan grupta H_2O_2 miktarlarının en yüksek değerlerinin saptanması ile desteklenmektedir. SHAM'ın antioksidan enzimlerin aktiviteleri üzerine sebep olduğu değişiklikler, AOX'un antioksidan sistem üzerine önemli etkiye sahip olduğunu açıkça ortaya koymaktadır.

Mevcut çalışmamız da elde ettiğimiz sonuçlar, soğuk stresinin hem nohut hem de buğday bitkilerinde APX ve GR aktivitelerini önemli oranda artırdığını göstermektedir. Bu sonuçlar önceki araştırmacılar tarafından elde edilen bulgularla uyumludur. Birçok araştırmacı soğuk stresine maruz kalan bitkilerde APX ve GR aktivitelerinin arttığını bildirmiştir (Van Heerden and Krüger 2002, Kaur *et al.* 2011; Erdal 2012). Oysaki solunum inhibitörlerinin uygulanması bu enzimlerin aktivitelerini sadece soğuk stresine maruz kalanlara kıyasla çok ciddi derecelerde yükseltmiştir. En yüksek APX ve GR aktiviteleri ise AOX aktivatörü olan piruvat uygulanan bitkilerde belirlenmiştir. AOX'un etkisini pekiştirmek için yapılan SHAM uygulaması, APX ve GR aktivitelerinde büyük düşüslere neden olmuştur. Hatta bu durum APX izoenzimlerinin belirlendiği doğal elektroforezde çok belirgin olarak görülmektedir. SHAM uygulaması izoenzim bantlarının sayısında ve yoğunluğunda kaydedeğer azalmalara neden olmuştur. Bu duruma göre, AOX' un inhibe olması ile ROT'larda meydana gelen artışa bağlı

olarak antioksidan sistemin önemli derecede etkilendiği söylenebilir. APX ve GR'deki büyük düşüşler AOX inhibisyonuna bağlı olarak yükselen H₂O₂ miktarlarını bitkilerin tolere edemediklerini ve bunun sonucunda hasarın arttığını göstermektedir. Nitekim, lipid peroksidasyon seviyeleri göz önüne alındığında, SHAM uygulanan bitkilerde ki MDA içeriğinin diğer bitkilere oranla ciddi miktarlarda yüksek olduğu görülür.

Soğuk stresine maruz kalan bitkilerin enzimatik antioksidan sistemlerinin yanı sıra, non-enzimatik antioksidan sistemleri üzerine de çok sayıda çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalar da önemli antioksidan maddeler olan askorbat ve glutatyon içeriklerine bakılmış ve soğuk stresinin genel olarak bu maddelerin miktarında önemli artışlara neden olduğu belirlenmiştir. Nohut bitkisinin soğuğa maruz kalınca askorbat ve glutatyon içeriklerinde önemli artışlar meydana geldiği rapor edilmiştir (Kaur *et al.* 2011; Genisel *et al.* 2013). Benzer bir çalışmada ise *Pisum sativum* (bezelye) bitkisinin 22°C'lik yetişme ortamından 6C°'lik bir ortama aktarılınca askorbat ve glutatyon içeriğinde dikkat çekici bir artış belirlenmiştir (Streb *et al.* 2003). Mısır bitkisinde yapılan çalışmalarda da soğuk stresinin askorbat ve glutatyon içeriğinde önemli artışlara neden olduğu bildirilmiştir (Erdal 2012). Askorbat ve glutatyon maddeleri hem kendi başlarına antioksidan madde olup ROT'ların süpürülmesinde görev alırlarken, hem de H₂O₂'nin detoksifikasyonunda rol oynayan askorbat-glutatyon çemberinin en önemli bileşenleridirler. Soğuk uygulaması ile bu maddelerin miktarlarında meydana gelen artışlar, bitkinin soğuk stresine karşı savunma sistemini aktifleştirdiği ve kendini korumaya çalıştığı anlamına gelir. Mevcut çalışmada elde edilen bulgular da literatürle büyük bir uyum göstermektedir. Soğuk stresine maruz kalan buğday ve nohut bitkilerinde askorbat ve glutatyon içeriklerinde önemli artışlar belirlendi. Solunum inhibitörleri ile piruvat uygulaması yapılan bitkilerde ise askorbat ve glutatyon içeriklerindeki artışın çok daha fazla olduğu belirlendi. En yüksek askorbat ve glutatyon içerikleri hem nohut hem de buğday bitkileri için piruvat uygulamasında kaydedildi. Bu bulgu göstermektedir ki alternatif solunum yolunun uyarılması ile sadece enzimatik savunma sistemi değil, aynı zamanda non-enzimatik antioksidan sistemi de önemli derecede aktifleştirilmektedir. Bu da bitkinin soğuğa karşı çok daha dirençli olmasına yardım etmektedir. Çünkü Kocsy *et al.* (2000) yaptığı çalışmada glutatyon içeriği

artırılabilirse soğuk stresine toleransın artacağını bildirmiştir. Bu durumda, alternatif solunum yolunun aktifleştirildiği bitkilerde glutatyonun yanı sıra askorbatın da miktarının çok yüksek olması bu bitkilerin soğuğa karşı çok daha toleranslı hale geldiklerini göstermektedir. Artan askorbat ve glutatyon içeriğine paralel olarak bu yol ile ilgili enzimlerin yani APX ve GR enzimlerinin aktivitelerinde de önemli artışların belirlenmesi bu yolun aktifleştğini doğrulamakta ve ROT'ların detoksifikasyonunu hızlandırdığı için bitkilerin toleransını artırdığı hipotezini desteklemektedir. AOX'un antioksidan madde içeriği üzerine pozitif etkilere sahip olduğu hipotezini daha da kuvvetlendirmek için SHAM uygulaması yaptığımız bitkilerde askorbat-glutatyon içeriklerinin yanında APX ve GR enzim aktiviteleride araştırılmış ve bu enzimlerin aktivitelerinde önemli düşüşler belirlenmiştir. Bu da açıkça ortaya koymaktadır ki, alternatif solunum yolunun uyarılması ile sadece antioksidan enzimlerin aktivitesi değil, non-enzimatik maddelerin içeriğinde de önemli artışlar meydana gelmekte ve bitki toleransı önemli derecede artırılmaktadır. Bu sonuçlar gerek oksijen tüketiminden gerekse western blot tekniği ile elde edilen sonuçlar tarafından kuvvetli bir biçimde desteklenmektedir. AOX'un kendisinin mitokondride ROT'ların oluşmasını önlemede ilk basamak olması, ayrıca AOX'un aktivitesinin arttığı belirlenen uygulamalarda ROT'ların önemli oranda azaldığının belirlenmesi de mevcut araştırmada elde edilen sonuçlar ile son derece uyumludur.

5.2. Azid, Antimisin A, Piruvat ve SHAM Uygulamalarının ROT Oluşumu Üzerine Etkileri

Nohut ve buğday bitkisinin soğuğa maruz kalması $O_2^{\cdot-}$ ve H_2O_2 içeriklerinde ciddi miktarlarda artışa neden olurken; azid, antimisin A ve piruvat uygulamalarının hepsinde bu ROT'ların miktarlarında önemli düşüşler olduğu belirlenmiştir. AOX inhibitörü olan SHAM uygulaması ise her iki bitkide de $O_2^{\cdot-}$ ve H_2O_2 oluşumunu önemli derecede artırdı. Soğuk uygulamasına kıyasla bu toksik oksijen türlerinin en düşük düzeyleri ise hem buğday hem de nohut için AOX aktivatörü olan piruvatın uygulandığı bitkilerde belirlendi.

Soğuk stresinin $O_2^{\bullet-}$ ve H_2O_2 içeriklerinde artışa neden olduğunu gösteren çok sayıda çalışma vardır. Genisel *et al.* (2013) soğuk stresine maruz bırakılan nohut bitkilerinde $O_2^{\bullet-}$ ve H_2O_2 içeriklerinde önemli artışların meydana geldiğini bildirmiştir. Benzer şekilde *Chorispora bungeana* bitki hücre kültürlerinin düşük sıcaklığa maruz kalması sonucu hem $O_2^{\bullet-}$ hem de H_2O_2 içeriklerinde iki kat kadar bir artış olduğu saptanmıştır (Liu *et al.* 2011). Bitkilerde hem kloroplastlarda hem de mitokondrilerde toksik oksijen türleri ROT'lar oluşmaktadır. Diğer stres şartlarında olduğu gibi soğuk stresinde de ROT miktarında önemli artışlar meydana gelmektedir. Bu durum artan solunum hızı ve elektron taşıma zincirinin aşırı indirgenmesi sonucu radikal üretiminin artması, soğuk nedeniyle hareketleri azalan ve viskozitesi artan zarlarda meydana gelen kırılmalar ve antioksidan sistemlerin detoksifiye etmekte yetersiz kalması ile açıklanabilir. Bu oksidan moleküller detoksifiye edilemezlerse oksidatif hasara neden olurlar. ROT'ların en önemlilerinden bir olan ve diğer ROT'ların öncülü olarak kabul edilen $O_2^{\bullet-}$ radikali SOD enzimi tarafından detoksifiye edilmezse hem kendi doğrudan hücre kompartmanlarına özellikle membranlara saldırıp doğrudan zarar verebilecek, hem de H_2O_2 ile birleşerek canlı hücrelerin gördüğü en toksik ve zararlı radikal olan $\cdot OH$ radikalinin oluşumuna öncülük edecektir. Bu nedenle soğuk stresi altında bitkilerde SOD aktivitesinde yükselmeler olmasına karşın, stresin büyüklüğü arttıkça enzimin aktivitesi artmasına rağmen aşırı miktarda üretilen $O_2^{\bullet-}$ radikalini parçalamaya kafi gelemeyeceğinden hücrede $O_2^{\bullet-}$ radikali miktarı giderek artacak ve oksidatif hasara neden olacaktır. Literatüre uygun olarak mevcut araştırmada da soğuğa maruz bırakılan buğday ve nohut bitkilerinin SOD aktivitelerinde artış belirlenmesine karşın, $O_2^{\bullet-}$ radikali miktarında da önemli artışlar belirlendi. Bu da gösteriyorki artan enzim aktivitesi, stres tarafından aşırı miktarda üretilmesi sağlanan $O_2^{\bullet-}$ radikallerini yeterli bir şekilde detoksifiye edememekte ve bu nedenle soğuk stresi tarafından artırılan $O_2^{\bullet-}$ radikali miktarı oksidatif hasarın meydana gelmesinde önemli rol oynamaktadır. Artan $O_2^{\bullet-}$ radikallerine paralel olarak onların detoksifikasyonu ile meydana gelen H_2O_2 miktarında da önemli artışlar belirlendi. H_2O_2 kendisi radikal olmamakla birlikte $\cdot OH$ radikalinin potansiyel bir öncüsü olduğu için canlı sistemler için çok tehlikelidir (Li *et al.* 2010; Erdal 2010). Ancak düşük konsantrasyonlarda H_2O_2 çok önemli sinyal roller oynayarak bitkinin savunma sisteminin aktifleşmesini sağlar.

Mevcut çalışmada eksojen olarak uyguladığımız solunum inhibitörleri ile AOX aktivatörünün bitkilerde gerek $O_2^{\bullet-}$ ve gerekse H_2O_2 miktarlarında önemli düşüslere neden olduğu belirlendi. Bunu şöyle yorumlamak mümkündür ki, bu maddeler ya alternatif solunumu uyararak elektron kaçaklarının dolayısıyla ROT oluşumunun önüne geçmiş olabilir, ya da antioksidan sistemi güçlendirerek ROT'ların detoksifikasyonunu artırmış olabilir. Gerek AOX aktivitesinin ölçülmesinden, gerek western blot tekniği ile AOX ifadesinin belirlenmesinden, gerekse antioksidan sistemin aktivitesinin ölçülmesinden elde edilen sonuçlar gösteriyor ki; bu maddeler AOX enzimini uyararak hem alternatif solunumu yolunu aktifleştirmekte, hem de dolaylı ya da doğrudan antioksidan sistemin aktifleşmesini sağlayarak oluşan ROT'ların detoksifikasyonunu hızlandırmaktadır.

Mitokondrilerde ROT'ların kaynağının kompleks I ve kompleks III olduğu gösteren bir çok çalışma vardır (Popov *et al.* 1997; Navrot *et al.* 2007). Dolayısıyla AOX enziminin aktivitesinin artması, kompleks I'den sonra elektronları oksijene verdiği için, kompleks III' ten kaynaklanan elektron kaçaklarını azaltarak ROT'ların miktarında azalmalara yol açması kuvvetle muhtemeldir. Bu hipotezi destekler çalışmalar mevcuttur. Moller and Kristensen (2004), AOX'un ROT oluşumunu önleyen ilk basamak olarak işlev gördüğünü belirtmiştir. Başka bir çalışma da ise AOX' un hücre içi oksijen-su konsantrasyonunun korunmasında etken olduğu böylece ROT oluşumunu azalttığı belirtilmiştir (Maxwell *et al.* 1999). Mevcut çalışmamızda kullanılan ve AOX'u daha aktif hale getiren maddelerden antimisin A ve azid maddelerinin, sitokrom yolundaki kompleks III ve kompleks IV'ü inhibe ederek elektronların AOX'tan geçişine neden oldukları ve böylece ROT oluşumunu azalttıkları muhtemeldir.

AOX aktivatörü olan piruvat uygulanan bitkilerde hem $O_2^{\bullet-}$ hem de H_2O_2 miktarının tüm uygulamalara göre en düşük düzeyde kalması, AOX'un ROT oluşumunu azalttığı hipotezini desteklemektedir. Ayrıca bu hipotezin sağlamlığını ölçmek için AOX inhibitörü olan SHAM uygulamasından elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde, SHAM uygulanan bitkilerin hem antioksidan sistemlerinde büyük bir düşüş, hem de toksik radikallerinde önemli oranda artış tespit edilmiştir. Tüm bu sonuçlara bakınca

AOX'un aktif hale getirilmesi hem radikal oluşumunu önlemeye katkı sağlaması açısından doğrudan, hem de H₂O₂ düzeyininin düşük seviyede tutulmasını sağlayarak onun sinyal rolü oynamasını sağlayıp antioksidan sistemi daha aktif hale getirerek dolaylı yoldan oksidatif hasarın azalmasında etkili olduğu söylenebilir. Ayrıca AOX aktivitesinin azalması antioksidan sistemi de negatif etkilediğinden, artan ROT'ların detoksifikasyonu da azalacak ve böylece oksidatif hasar giderek artacaktır. Bu yönüyle antioksidan enzim aktiviteleri ile ROT miktarı ve AOX aktivitesinden elde edilen bulgular birbirleriyle son derece uyumlu ve birbirlerini destekler niteliktedirler.

5.3. Azid, Antimisin A, Piruvat ve SHAM Uygulamalarının MDA İçeriği Üzerine Etkileri

Hücre membranlardaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları, serbest radikallerle kolayca reaksiyon vererek peroksidasyon ürünlerini oluştururlar. Çoklu doymamış (poliansatüre) yağ asitlerinin oksidatif yıkımı, lipid peroksidasyonu (LPO) olarak adlandırılır. LPO kendi kendini devam ettiren zincir reaksiyonu şeklinde ilerler ve bu şekilde oluşan membran hasarları geri dönüşümsüzdür (Akkus 1995). LPO'nun son ürünü olarak malondialdehit (MDA) oluştuğu için, MDA miktarının ölçülmesi zarlardaki dönüşümsüz hasarlarının belirlenmesinde kullanılan iyi bir indikatördür (Balestrasse *et al.* 2010). Birçok literatür soğuk stresinde meydana gelen ilk hasarın hücre zarlarının bütünlüğünü kaybetmesi olduğunu göstermektedir (Kuk *et al.* 2003; Tambussi *et al.* 2004; Turan and Ekmekci 2011). Bu nedenle soğuk stresinin bitkiler üzerinde meydana getirdiği hasarı belirlemek için MDA miktarının ölçülmesi çok önemlidir.

Mevcut çalışmada soğuk stresine maruz kalan buğday ve nohut bitkilerinde MDA içeriklerinin önemli derecelerde artış gösterdiği belirlenmiştir. Bu sonuç önceki araştırmacıların elde etmiş olduğu sonuçlarla uyumludur. Genisel *et al.* (2013) yapmış olduğu çalışmada soğuk stresine maruz bırakılmış nohut bitkilerinde MDA miktarının kontrole oranla önemli derecede arttığını bildirmişlerdir. Benzer şekilde Esim *et al.* (2012), soğuk stresinin buğday bitkilerininin MDA içeriğini ciddi bir biçimde artırdığını

rapor etmiştir. Soğuk stresine maruz kalan bitkilerde MDA miktarındaki artışlar, zarların viskozitesindeki azalma nedeniyle kırılabilirliklerinin artması ve ROT'ların miktarındaki artış nedeniyle zarlarda meydana gelen LPO'ya bağlanabilir. Bu varsayım soğuk stresine maruz kalan bitkilerde belirlenen $O_2^{\bullet-}$ ve H_2O_2 miktarındaki aşırı yükselme ile de desteklenmektedir. Diğer yandan, bu bitkilerde antoksidan sistemde aktifleşmiş olmasına rağmen, artan antioksidan aktivitenin aşırı miktarlarda üretilen ROT'ları bertaraf etmede yetersiz kaldığı ve bunun sonucunda ise zarların hasar gördüğü açıkça ortadadır.

Literatürde eksojen olarak uyarılmış alternatif solunumu yolunun LPO üzerine etkilerini gösteren herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Son yıllarda transgenik tütün bitkisinde yapılan bir çalışmada, transgenik olarak AOX ekspresiyonu artırılmış ve baskılanmış tütün bitkileri soğuk stresine maruz bırakıldığı zaman AOX ifadesi artırılan bitkide LPO seviyesinin daha düşük olduğu belirlenmiştir (Wang *et al.* 2011).

Oysaki AOX'u aktive etmek için eksojen olarak uygulanan solunum inhibitörlerinden azid ve antimisin, MDA miktarının kaydadeğer bir şekilde azalmasına neden olmuştur. Bu durum AOX aktivitesinin artmasına bağlı olarak ROT'ların miktarında meydana gelen azalmayla ilgili olabilir. Mevcut çalışmada özellikle antimisin A uygulaması hem $O_2^{\bullet-}$ ve H_2O_2 içeriğini, hem de MDA içeriğini ciddi biçimde azaltmıştır. Antimisin A uygulamasıyla toksik radikal olan $O_2^{\bullet-}$ üretim kaynaklarından biri olan kompleks III'ün inhibe olduğu ve elektronların alternatif solunum yolunu tercih etmek zorunda kaldığı söylenebilir.

Buğday ve nohut bitkilerinin her ikisinde de en düşük MDA içeriği piruvat uygulanan bitkilerde elde edilmiştir. Piruvatın AOX aktivatörü olarak işlev görüp, elektron taşıma zincirinin aşırı indirgemesinin önüne geçilmesine yardımcı olduğu söylenebilir. Çünkü MDA düzeyinde ki düşüşe paralel olarak $O_2^{\bullet-}$ ve H_2O_2 miktarlarında ki en düşük değerlerde piruvat uygulanan bitkilerde elde edilmiştir. Ayrıca bu bitkilerde H_2O_2 'nin düşük düzeyde bulunması, aynı zamanda antioksidan sistemi harekete geçirmede sinyal görevi üstlenmesine neden olabilir. Böylece daha etkin bir savunma mekanizması ile

LPO düzeyi düşük tutulmuş olabilir. En düşük ROT miktarı ve en düşük LPO seviyesinin yanı sıra, en yüksek antioksidan aktivitenin de piruvat uygulanan bitkilerde belirlenmesi AOX'un membran hasarını önlemede önemli katkıda sağladığını açıkça ortaya koyar. AOX'un bu etkisini desteklemek için, AOX inhibitörü olan SHAM uygulanan bitkiler incelenmiş ve bu bitkilerde piruvat uygulamasının aksine MDA içeriğinin sadece soğuk stresli bitkilere oranla çok yüksek bir artış gösterdiği belirlenmiştir. Bu bulgu, LPO üzerine AOX'un pozitif etkisini daha belirgin şekilde ortaya koymaktadır. SHAM uygulanan bitkilerde LPO'nun en yüksek değere sahip olması, alternatif solunum yolu inhibe olduğu için, solunumun hızlanması sonucunda elektron taşıma zincirinin aşırı yüklenmesi ve buna bağlı olarak ROT'ların miktarındaki ciddi artışlar ile açıklanabilir. Bunun yanı sıra SHAM tarafından antioksidan sistem de ciddi oranlarda indirildiği için, aşırı miktarda üretilen ROT'lar bertaraf edilemediğinden dolayı da membranlardaki hasarın boyutunun artması kuvvetle muhtemeldir.

Sadece ROT'ların oluşumunu azaltması veya antioksidan sistemi aktive etmesiyle değil, aynı zamanda içsel bir ısı artışına neden olduğu için de AOX membran hasarını azaltmada önemli rol oynayabilir. Çünkü AOX'ten geçen elektronlar oksijeni suya indirgerken ubikinon-oksijen arası serbest enerjiji ısı olarak yaydığı kanıtlanmıştır (Vanlerberghe and McIntosh 1997). Bitki dışındaki soğuk şartlara rağmen AOX aktivitesinin artması içsel ısı artışının bitkiye direnç kazandırdığı da söylenebilir.

5.4. Azid, Antimisin A, Piruvat ve SHAM Uygulamalarının Hücresel Solunum ve Alternatif Solunuma Etkileri

Alternatif solunum yolunun buğday ve nohut bitkilerinin soğuğa karşı toleransları üzerine etkilerini açıklayabilmek ve mevcut araştırmada kullanılan AOX aktivatörleri olan azid, antimisin A ve piruvatın toleransı artırmada, SHAM'ın ise toleransı azaltmada ki rollerini kanıtlayabilmek için bu bitkilerde AOX enziminin aktivitesi ile toplam solunum miktarı ölçüldü. Hem AOX aktivitesi (alternatif solunum) hem de

toplam solunum oranını belirlemek için bitki yapraklarından izole edilen mitokondriler kullanılmış ve oksijen tüketiminden yararlanılarak bu değerler tespit edilmiştir.

Araştırma sonucunda soğuk uygulamasının hücresel total solunum değerini ciddi anlamda artırdığı belirlenmiştir. Bu bulgu önceki araştırmacıların bildirdiği sonuçlarla uyumludur. Zhou and Solomos (1998) tarafından yapılan çalışmada, patates yumruları düşük sıcaklık stresine maruz bırakılmış ve solunum değerinde üç kat artış olduğu gözlemlenmiştir. Benzer bir çalışmada soğuk stresine maruz bırakılan lale soğanlarında O₂ tüketiminin dolayısı ile oksidatif fosforilasyon hızının arttığı gözlemlenmiştir (Kannerworff and Van Der Plas 1994). Öte yandan, normal koşullar altında düşük değere sahip olan alternatif solunum oranı stres şartlarında arttığını gösteren çalışmalar mevcuttur. Patates yumrularını normal yetiştirme koşullarından düşük sıcaklık şartlarına aktarılması ile AOX kapasitesinin on kata kadar arttığı saptanmıştır (Borecky and Vercesi 2005). Mevcut çalışmada da soğuk stresi, her iki bitkinin sitokrom yolu solunum değerinde olduğu gibi alternatif solunum değerini de ciddi anlamda artırmıştır. Stres şartlarına maruz kalan bitkilerde alternatif solunumun artması, bitkinin soğuk stresine karşı daha toleranslı olabilmeleri için içsel ısı miktarını artırması ile ilgili olabilir.

Antimisin A, kompleks III'teki sitokrom *c1* ile sitokrom *c* arasındaki elektron akışını keserek kompleks III'ün inhibisyonuna neden olur (Storey 1972; Roberts *et al.*1980). Bunun yanı sıra, antimisin A uygulaması ile AOX aktivitesinin arttığı da bildirilmiştir (Vanlerberghe and McIntosh 1996; Geisler *et al.*2004). Mevcut çalışmadan elde edilen bulgularda bu sonuçlara paraleldir. Antimisin A uygulanan bitkilerde sitokrom yolunda tüketilen O₂ miktarında önemli oranda azalma meydana gelirken, AOX aktivitesinde ise buna zıt bir şekilde önemli bir artış kaydedilmiştir. Bu durum antimisin A'nın kompleks III'ü inhibe ederek elektronların sitokrom yolu yerine alternatif solunum yoluna kaymasına bağlanabilir. Bunun sonucu olarak sitokrom yolundaki O₂ tüketiminin azalmasının sebebi ise, elektronların alternatif solunum yoluna kayması nedeniyle sitokrom yolunda O₂'nin tüketildiği yer olan kompleks IV'e ulaşamamasına bağlanabilir.

AOX enziminin aktif birimlerinin piruvat gibi α -keto asitler tarafından daha da aktifleştirildiği bildirilmiştir (Millar *et al.* 1993; Pastore *et al.* 2001). Mevcut araştırmada da benzer bulgular elde edilmiştir. En yüksek AOX aktiviteleri piruvat uygulanan bitkilerde ölçülmüştür. Piruvat uygulaması total hücresel solunum değerini düşürmezken, AOX aktivitesini dikkate değer oranda artırmıştır. Stres şartlarında zaten aktif hale geçen AOX monomerleri, piruvat ile daha da aktifleştirilmiştir.

AOX inhibitörü olan SHAM uygulanan bitkilerde ise, soğuk uygulamasına göre total solunum değerinde önemli azalmalar belirlenirken, AOX aktivitesindeki azalma çok daha yüksek miktardadır. SHAM uygulaması ile AOX'tan O_2 'ye elektron aktarımı kesilmiş ve bu yoldan O_2 tüketimi kısıtlanmıştır. Yani alternatif solunum yolu inhibe olmuştur.

AOX aktivitesi ve total solunumu yolu ile ilgili tüm bu veriler birlikte ele alındığında, açıkça görülmektedirki, soğuk stresine maruz kalan bitkilerde hem normal sitokrom yolu hemde alternatif solunum yolunda önemli artışlar meydana gelmektedir. Soğuk stresine maruz kalan bitkilerde solunumun hızında meydana gelen artış, ısı üretirek soğuğa tolerans sağlamaya ilgili olabilir. Çünkü solunum hızlandıkça ona bağlı bir yan yol olan alternatif solunum yolunda hızlanacaktır. Öte yandan, solunum inhibitörleri ya da AOX aktivatörü uygulanan bitkilerin alternatif solunum yolunun uyarılması ise soğuğa tolerans sağlamada kullanmak üzere ısı üretiminin artırılması ile ilgili olabilir. AOX aktivitesi artan bitkilerde ROT'ların miktarında kaydedilen azalma ile azalan LPO seviyesi bu varsayımı destekler niteliktedir. Benzer şekilde piruvat uygulamasında AOX aktivitesini belirgin bir biçimde artırmış ve soğuğa karşı toleransta önemli bir avantaj sağlamıştır. Bu bulguları destekler ve doğrular bir şekilde, SHAM uygulanan bitkilerin AOX aktivitelerinde önemli düşüşler belirlenmiş ve bu düşüşlere paralel olarak ROT'ların miktarında ve LPO seviyelerinde ciddi artışlar meydana gelmiştir.

5.5. Azid, Antimisin A, Piruvat ve SHAM Uygulamalarının AOX Proteinin İfadesi ve Aktivitesi Üzerine Etkileri

Normal koşullar altında yaşayan bitkilerin AOX aktivitesi ve protein konsantrasyonu düşük olmasına rağmen, biyotik ve abiyotik stres şartları altında AOX genlerinin ekspresyonu artırıldığından AOX proteinin konsantrasyonunda da belirgin artışlar meydana gelir (Simons and Lambers 1999; Finnegan *et al.* 2004; Vanlerberghe *et al.* 2009). Mevcut çalışmada mitokondrial proteinlerden elde edilen örneklerle western blot analizi yapılmış ve AOX protein konsantrasyonu belirlenmiştir. Analiz sonucunda AOX ifadesinin kontrol şartlarına oranla soğuk uygulanan bitkilerde dikkate değer bir şekilde arttığı gözle görülebilmektedir. Bu durum soğuk stresine maruz kalan bitkilerin mitokondrilerden gönderilen sinyallerin çekirdeğe ulaşması sonucu AOX proteinini kodlayan genlerin aktif hale geçtiği şeklinde yorumlanabilir. Tüm bu bulgular açıkça ortaya koymaktadır ki, soğuk stresi sadece AOX enziminin aktivitesinde değil, aynı zamanda genlerin aktivasyonu ile meydana gelen protein ifadesinde de ciddi artışlara neden olmaktadır. Soğuk stresinin AOX proteininin ifadesi üzerine yapılan önceki çalışmalardan elde edilen sonuçlarda bu bulgularla son derece uyumludur. Bu konuda yapılan çalışmalarda, soğuk stresinin AOX ifadesini önemli oranda artırdığı birçok araştırmacı tarafından rapor edilmiştir (Vanlerberghe and McIntosh 1997; McIntosh *et al.* 1998; Zhou and Solomos 1998; Calegario *et al.* 2003).

Stres öncesi azid, antimisin A ve piruvat uygulanan buğday ve nohut bitkilerinde AOX proteini ifadesinin sadece soğuğa maruz bırakılan bitkilere göre belirgin bir artış gösterdiği tespit edilmiştir. Bu sonucu destekler nitelikte çalışmalar mevcuttur. Vanlerberghe and McIntosh (1992b) *Nicotiana tabacum* bitkisi ile yaptıkları çalışmada, hücre kültürü ortamına antimisin A ilave edilmesinden 5 saat sonra AOX protein miktarında önemli bir artış meydana geldiğini saptamışlardır. Aynı araştırmacılar başka bir çalışmada AOX aktivitesinin mi yoksa ifadesinin mi etkilendiğini belirlemek amacıyla antimisin A ile birlikte RNA sentezi inhibitörü olan aktinomisin D ve hücre içi protein sentezi inhibitörü olan sikloheksimidenini hücre kültürü ortamına eklemişler; 8 saat sonra yaptıkları immunolojik saptamada AOX protein miktarında bir artış

olmadığını tespit etmişlerdir. Elde edilen sonuçlara göre antimisin A'nın sadece AOX aktivitesini değil aynı zamanda AOX proteinlerinin *de novo* sentezini de artırdığını saptamışlardır. AOX proteininin ifadesi çekirdek genomu tarafından kontrol edildiğinden dolayı, mevcut çalışmada belirlenen AOX ifadesindeki artışın antimisin A ve piruvat tarafından çekirdekdeki genlere şu an ne olduğu bilinmeyen bir sinyal gönderilerek sağlandığı söylenilebilir.

Yapılan immunolojik saptamada en fazla AOX protein konsantrasyonu, AOX aktivatörü olan piruvatın uygulandığı bitkilerde belirlenmiştir. Bu durum soğuk stresi tarafından ifadesi ve aktivitesi artırılan AOX dimer ve monomerlerinin, piruvat tarafından daha da aktive edilmesi sonucunda çekirdekdeki genlerin etkilenmesiyle AOX protein ifadesinin uyarıldığı şeklinde yorumlanabilir. Oksijen tüketiminden elde edilen bulgular da, AOX ifadesine paralel olarak en yüksek AOX aktivitesinin de piruvat uygulanan bitkilerde belirlendiğini ortaya koymaktadır.

Elde edilen bulguların güvenilirliğini test etmek için AOX inhibitörü olan SHAM'ın uygulandığı bitkilerde immunolojik saptama sonucunda, kontrole göre yüksek ama soğuk stresine oranla daha az AOX proteini konsantrasyonu belirlenmiştir. Soğuk uygulamasına kıyasla SHAM uygulamasının AOX aktivitesini ciddi oranda azalttığı görülmektedir. Bu bulgular göstermektedir ki, SHAM uygulaması öncelikle AOX enziminin aktivitesini inhibe etmiş, daha sonrada gen ifadesi ve/veya sentez mekanizmalarını olumsuz etkilemiş olabilir. Bu olumsuz etki, AOX'un inhibisyonu neticesinde aşırı miktarlarda üretilen ROT'lar nedeniyle oksidatif hasarın önemli derecede artması ve çekirdeğe ulaşması gereken sinyal iletim yollarının zarar görmüş olması ile ilgili olabilir. Ya da çekirdek tarafından kodlanan genlerin, sentez reaksiyonlarının herhangi bir aşamasında ROT'lar tarafından meydana getirilebilecek çeşitli aksaklıklar nedeniyle ifadesi azalmış veya engellenmiş olabilir. Bu durumu açıklığa kavuşturmak ve etki mekanizmasını aydınlatmak için AOX genlerinin mRNA düzeyinde tesbit edileceği ileri çalışmalar ihtiyaç vardır.

Sonuçlar

1) Mevcut çalışmadan elde edilen bilgiler açıkça göstermektedir ki, alternatif solunum yolunun uyarılması ile antioksidan sistemin aktifleşmesi arasında pozitif bir korelasyon vardır. AOX inhibitörü olan SHAM tarafından antioksidan sistemin inhibe edilmesi bu pozitif korelasyonu doğrulamaktadır. Gerek solunum inhibitörleri olan azid ve antimisin A, gerekse AOX aktivatörü olan piruvatın uygulanması ile hem buğday hemde nohut bitkilerinin enzimatik ve non-enzimatik antioksidan savunma sistemi önemli derecede uyarılmıştır.

2) Alternatif solunum yolunun teşviki ile antioksidan sistemde meydana gelen aktifleşmeye paralel olarak süperoksit radikali ve hidrojen peroksit gibi reaktif oksijen türlerinin miktarlarında önemli azalmalar meydana gelmiştir. Oysaki SHAM uygulanan bitkilerde gözlenen önemli artış, AOX'un reaktif oksijen türleri üzerinde doğrudan ve dolaylı olarak önemli etkiye sahip olduğunu vurgulamaktadır.

3) Alternatif solunum tarafından tetiklenen hem antioksidan sistemdeki artışla, hem de reaktif oksijen üretimindeki azalışla koordineli olarak lipit peroksidasyon seviyesinde önemli azalmalar belirlenmiştir. Bu da bitkilerde alternatif solunumun uyarılmasıyla soğuk stresi tarafından neden olunacak oksidatif hasarın önemli derecede indirgeneceğini ve aynı oranda bitkilerin soğuğa karşı toleranslarının artacağını ortaya koymaktadır.

4) Hücresel toplam solunum değerleri ve alternatif solunum değerleri göz önüne alındığında, soğuk stresinin hem hücresel solunumu hem de alternatif solunumu artırdığı görülmektedir. Gerek solunum inhibitörleri gerekse alternatif solunum aktivatörü olan maddelerin uygulanması ile alternatif solunum çok daha büyük oranlarda artırılmıştır. Oysaki SHAM uygulaması AOX aktivitesini önemli bir biçimde inhibe ederek alternatif solunumu indirmiştir.

5) AOX proteinlerinin immunolojik olarak western blot yöntemi ile saptanması sonucunda soğuk stresinin AOX proteinin ifadesini artırdığı, ancak solunum inhibitörlerinin bu ifadeyi çok daha yüksek oranda artırdığı belirlenmiştir. En yüksek AOX ifadesi piruvat uygulanan bitkilerde belirlenmiştir. SHAM uygulaması ise tüm uygulamalara göre en düşük AOX ifadesini ortaya çıkarmıştır.

Sonuç olarak hem solunum inhibitörleri olan azid ve antimisin A hemde AOX aktivatörü olan piruvat uygulaması alternatif solunumun önemli derecede artmasına neden oldu. Alternatif solunumun aktifleştiği, artan AOX aktivitesi ve AOX proteini ifadesi ile kanıtlandı. Alternatif solunum yolu doğrudan reaktif oksijenlerin üretimini azalmasına neden olmakla birlikte, dolaylı olarak ta antioksidan sistemi aktifleştirerek detoksifikasyonu hızlandırmak suretiyle de etki gösterdiği ortaya çıkarılmıştır. Hem enzimatik hemde non-enzimatik antioksidan sistemden elde edilen veriler alternatif solunumu yolunun bu sistem üzerine etkin olduğunu göstermektedir. Alternatif solunum yolunun inhibe edilmesi ile paralel olarak reaktif oksijen miktarında meydana gelen artışlar ve antioksidan sistemin olumsuz etkilenmesi de bu etkiyi kuvvetle desteklemektedir. Bunun yanı sıra, oksidatif hasarın bir ölçüsü olan lipid peroksidasyonun da alternatif solunumla paralel etki göstermesi elde edilen sonuçların güvenilirliğini açıkça ortaya koymaktadır.

Mevcut veriler birlikte ele alındığında, günümüzde en önemli çevresel streslerden biri olan soğuk stresine karşı alternatif solunumun aktifleştirilmesi ile bitki toleransının artırılabilceğini ve oluşabilecek ürün kaybı ve hasarın ciddi oranlarda önüne geçilebileceğini düşünmekteyiz. Bu amaçla sağlık üzerine etkileri bilinmeyen birçok kimyasal maddenin ve genetiği değiştirilmiş bitkilerin kullanılmasındansa bitkilerde doğal olarak var olan bu yolun aktifleştirilmesinin çok daha yararlı olacağı kanaatindeyiz. Ancak bu yolu aktifleştirmek için hangi maddelerin kullanılacağı, konsantrasyonlarının ne olacağı ve onların etki mekanizmalarının tam olarak ortaya konulacağı daha ileri çalışmaların yapılmasına ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

- Abdrakhmanova, A., Zickermann, V., Bostina, M., Radermacher, M., Schägger, H., Kersch, S., Brandt, U., 2004. Subunit composition of mitochondrial Complex I from the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Biochim. Biophys. Acta*, (1658), 148-156.
- Agarwal, S. and Pandey, V., 2004. Antioxidant enzyme responses to NaCl stress in *Cassia angustifolia*. *Biologia Plantarum*, 48(4), 555-560.
- Akkus, İ., 1995. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkiler, Mimoza Yayınları, Konya.
- Alajaji, S.A. and El-Adawy, T.A., 2006. Nutritional composition of chickpea (*Cicer arietinum* L.) as affected by microwave cooking and other traditional cooking methods. *Journal of Food Composition and Analysis*, (19), 806-812.
- Amaya, I., Botella, M.A., Calle, M., Medina, M.I., Heredia, A., Bressan, R.A., Hasegawa, P.M., Quesada, M.A., Valpuesta, V., 1999. Improved germination under osmotic stress or tobacco plants overexpressing a cell wall peroxidase. *FEBS Lett.*, (457), 80-84.
- Anonymous, 1989. <http://vpopov.professorjournal.ru/26>.
- Aono, M., Saji, H., Fujiyama, S., Sugita, M., 1995. Decrease in Activity of Glutathione Reductase Enhances Paraquat Sensitivity in Transgenic *Nicotiana tabacum*, *Plant Physiol.*, (107), 645-648.
- Apel, K. and Hirt, H., 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.*, (55), 373-399.
- Asada, K., 1992a. Ascorbate peroxidase-a hydrogen peroxidescavenging enzyme in plants. *Physiol Plant*, (85), 235-241.
- Asada, K., 1992b. Production and scavenging of active oxygen in chloroplasts, in: J.G. Scandalios (Ed.), *Current Communications 5, In Cell and Molecular Biology, Molecular Biology of Free Radical Scavenging Systems*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp,173-192.
- Asada, K., 1997. The role of ascorbate peroxidase and monodehydroascorbate reductase in H₂O₂ scavenging in plants. See Ref., (185), 715-36.
- Bakardjieva, N. and Christov, K., 1996. Effect of calcium and zinc ions on the sensitivity of peroxidase from moses (*Mnium* sp.) and ferns (*Polydium vulgare*) to high temperature. *Can. J. Bot.*, (74), 1665-1670.
- Balestrasse, K.B., Tomaro, M.L., Batlle, A., Noriega, G.O., 2010. The role of 5-aminolevulinic acid in the response to cold stress in soybean plants. *Phytochemistry*, 71(17-18), 2038-45.
- Bauchanan, B.B., Schürmann, P., Wolosiuk, R.A., Jacquot, J.P., 2002. The ferredoxin/thioredoxin system: from discovery to molecular structures and beyond. *Photosynth. Res.*, 73, 215-222.
- Beck, E.H., Heim, R., Hansen, J., 2004. Plant resistance to cold stress: Mechanisms and environmental signals triggering frost hardening and dehardening; *J. Biosci.*, (29), 449-459.
- Belderok, B., Mesdag, H., Donner, D.A., 2000. *Bread-Making Quality of Wheat*. Springer, New York.

- Benichou, P., Calvayrac, R., Claisse, M., 1988. Induction by antimycin A of cyanide-resistant respiration in heterotrophic *Euglena gracilis*: effects on growth, respiration and protein biosynthesis. *Planta*, (175), 23-32.
- Bergmeyer, J. and Grabl, M., 1983. *Methods of Enzymatik Analysis* (Third Edition). Germany. 190-302.
- Berry, E.A., Guergova-Kuras, M., Huang, L.S., Crofts, A.R., 2000. Structure and function of cytochrome bc complexes. *Annu. Rev. Biochem.*, (69), 1005-1075.
- Bertrand, H., Argan, C.A., Szakacs, N.A., 1983. Genetic control of the biogenesis of cyanide insensitive respiration in *Neurospora crassa*. In Schweyen, R.J., Wolf, K., Kaudewitz, F.eds, *Mitochondria 1983*. Walter de Gruyter, Berlin, pp, 495-507.
- Beuchamp, C. and Fridovich, I., 1971. Isozymes of superoxide dismutase from wheat germ, *Biochim. Biophys. Acta*, (317), 50-64.
- Blokhina, O. and Fagerstedt, K.V., 2010. Reactive oxygen species and nitric oxide in plant mitochondria: origin and redundant regulatory systems. *Physiologia Plantarum*, (138), 447-462.
- Borecky, J. and Vercesi, A.E., 2005. Plant uncoupling mitochondrial protein and alternative oxidase: energy metabolism and stress. *Bioscience Reports*, (24), 269–283.
- Bowler, C., Slooten, I., Tsang, W.T., Vancamp, W., Vanmontagu, M., Inze, D., 1991. Oxidative stress in plants. *Nato Advanced Science Institutes Series, Series a, Life Sciences*, (212), 695-705.
- Bowler, C., Van Maontague, M. ve Inze, D., 1992. Superoxide Dismutase and Stress Tolerance, *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, (43), 83-116.
- Boyer, P.D., 1997. The Atp Synthase—A Splendid Molecular Machine. *Annual Review of Biochemistry*, (66), 717-749.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for t quantition of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding analiticl. *Biochem.*, (72), 248-254.
- Braidot, E., Petrusa, E., Vianello, A., Macr, F., 1999. Hydrogen peroxide generation by higher plant mitochondria oxidizing complex I or complex II substrates. *FEBS Letters*, 451(3), 347-350.
- Bruggemann, W., Dauborn, B., Klaucke, S., 1995. Chilling sensitivity of photosynthesis: ecophysiological studies in two *Lycopersicon* species of different chilling tolerance. *Acta Physiol. Plant.*, (17), 113-122.
- Buettner, G.R., Jurkiewicz, B.A., 1996. Chemistry and biochemistry of ascorbic acid. In *Handbook of Antioxidants*, ed. E Cadenas, L Packer, 91–115. New York: Dekker
- Burns, J.J., 1957. Missing step in man, monkey and guinea pig required for the biosynthesis of L-ascorbic acid. *Nature*, 180-553.
- Cadenas, E., 1989. Biochemistry of oxygen toxicity. *Annu. Rev. Biochem.*, (58), 79.
- Calegario, F.F., Cosso, R.G., Fagian, M.M., 2003. Stimulation of potato tuber respiration by cold stress is associated with an increased capacity of both plant uncoupling mitochondrial protein (PUMP) and alternative oxidase. *J. Bioenerg. Biomembr.*, (35), 211-220.
- Campbell, C., Atkinson, L., Zaragoza-Castells, J., Lundmark, M., Atkin, O., Hurry, V., 2007. Acclimation of photosynthesis and respiration is asynchronous in response

- to changes in temperature regardless of plant functional group. *New Phytol.*, (176), 375-389.
- Caulfield, F. and Bunce, J.A., 1988. Comparative responses of photosynthesis to growth temperature in soybean (*Glycine max* L. Merrill) cultivars. *Can. J. Plant Science*, (68), 419-425.
- Chaudiere, J. and Ferrari-Iliou, R., 1999. Intracellular antioxidants from chemical to biochemical mechanism. *Food Chem. Toxicol.*, (37), 949-962.
- Chen, W.P. and Li P.H., 2002. Membrane stabilization by abscisic acid under cold aids proline in alleviating chilling injury in maize (*Zea mays* L.) cultured cells. *Plant Cell Environ.*, (25), 955-962.
- Chien, L., Wu, Y., Chen, H., 2011. Mitochondrial energy metabolism in young bamboo rhizomes from *Bambusa oldhamii* and *Phyllostachys edulis* during shooting stage. *Plant Physiology and Biochemistry*, (49), 449-457.
- Clarke, H.J., Siddique, K.H.M., 2004. Response of chickpea genotypes to low temperature stress during reproductive development. *Field Crops Research*, (90), 323-334.
- Creissen, G., Broadbent, P., Stevens, R., Wellburn, A.R., Mullineaux, P.M., 1996. Manipulation of Glutathione Metabolism in Transgenic Plants, *J. Biochem.*, 24, 465-472.
- Creissen, G., Edwards, E.A., Mullineaux, P.M., 1994. Glutathione Reductase and Ascorbate Peroxidase, In: *Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defence Systems in Plants*, Foyer, C.H., Ed., Mullineaux, P.M., CRC Press. Boca Raton, 343-364.
- Davidson, J.F., Schiestl, R.H., 2001. Mitochondrial respiratory electron carriers are involved in oxidative stress during heat stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.*, (21), 8483-8489.
- Day, D.A., Millar, A.H., Wiskich, J.T., Whelan, J., 1994. Regulation of Alternative Oxidase Activity by Pyruvate in Soybean Mitochondria. *Plant Physiol.*, 106(4), 1421-1427.
- Dipierro, S. And Leonardis, S.D., 1997. The ascorbate system and lipid peroxidation in stored potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers. *J Exp Bot.*, (48), 779-783.
- Dron, M., Clouse, S.D., Dixon, R.A., Lawton, M.A., Lamb, C.J., 1988. Glutathione and fungal elicitor regulation of a plant defense promoter in electroporated protoplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, (85), 6738-42.
- Dudkina, N.V., Heinemeyer, J., Sunderhaus, S., Boekema, E.J., Braun, H., 2006. Respiratory chain supercomplexes in the plant mitochondrial membrane. *Trends in Plant Science*, 11(5), 232-240.
- Durmuş, N., 2003. Büyümeği düzenleyici maddelerin oksidatif stres üzerine etkileri. Doktora Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü., Trabzon.
- Elstner, E.F. and Heupel, A., 1976. Inhibition of nitrite formation from hydroxylammonium chloride: a simple assay for superoxide dismutase, *Anal. Biochem.*, (70), 616-620.
- Elstner, E.F., 1991. Mechanisms of oxygen activation in different compartments of plant cells, in: E.J. Pell, K.L. Steffen (Eds.), *Active oxygen:oxidative stress and plant metabolism*, Am. Soc. Plant Physiol., 13-25.

- Elthon, T.E., Nickels, R.L., McIntosh, L., 1989. Monoclonal antibodies to the alternative oxidase of higher plant mitochondria. *Plant Physiol.*, (89), 1311-1317.
- Erdal, S., 2010. Memeli Cinsiyet Hormonlarının Arpa ve Nohut Bitkilerinin Büyüme ve Gelişmeleri Üzerine Etkileri. Doktora Tezi. Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Erdal, S., 2012. Androsterone-induced molecular and physiological changes in maize seedlings in response to chilling stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, (57), 1-7.
- Erdoğan, C., 1997. Nohut bitkisinin bazı tarımsal özelliklerine gübrelemenin (N,P) ve aşılamanın etkisi. Yüksek Lisans Tezi, M.K.Üniv., Fen Bilimleri Enstitüsü, Antakya.
- Esim, N., Atici, O., Mutlu, S., 2012. Effects of exogenous nitric oxide in wheat seedlings under chilling stress. *Toxicol Ind Health*. DOI: 10.1177/0748233712457444.
- Esposti, M.D., 1998. Inhibitors of NADH-ubiquinone reductase: an overview. *Biochimica et Biophysica Acta*, (1364), 222-235.
- Eyidoğan, F.D., Öktem H.A., Yücel, M., 2003. Superoxide dismutase activity in salt stressed wheat seedlings. *Acta Physiologia Plantarum*, (25), 263-269.
- Feng, H., Li, X., Duan, J., Li, H., Liang, H., 2008. Chilling Tolerance of Wheat Seedlings Is Related to an Enhanced Alternative Respiratory Pathway. *Crop Science*, (48), 2381-2388.
- Finnegan, P.M., Soole, K.L., Umbach, A.L., 2004. Alternative mitochondrial electron transport proteins in plants. In: Day, D.A., Millar, A.H., Whelan, J.(eds), *Plant Mitochondria: From Genome to Function*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 163-230.
- Fiorani, F., Umbach, A.L., Siedow, J.N., 2005. The alternative oxidase of plant mitochondria is involved in the acclimation of shoot growth at low temperature. A study of *Arabidopsis* AOX1a transgenic plants. *Plant Physiol.*, (139), 1795-1805.
- Forti, G., Elli, G., 1995. The function of ascorbic acid in photosynthetic phosphorylation. *Plant Physiol.*, (109), 1207-11.
- Foyer, C., Noctor, G., 2005. Oxidant and antioxidant signaling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant Cell Environ.*, 28, 1056-1071.
- Foyer, C.H., 1993. Ascorbic acid, in: Alscher, R.G., Hess, J.L.(Eds.), *Antioxidants in higher plants*, CRC Press, Boca Raton, FL, 31-58.
- Foyer, C.H., Descouvieres, P. ve Kunert, K.J., 1994. Protection Against Oxygen Radicals: An Important Mechanism Studied in Transgenic Plants, *Plant Cell Environ.*, (17), 507-523.
- Foyer, C.H., Halliwell, B., 1976. The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta*, (133), 21-25.
- Foyer, C.H., Harbinson, J., 1994. Oxygen metabolism and the regulation of photosynthetic electron transport. In *Causes of Photooxidative Stresses and Amelioration of Defense Systems in Plants*, ed. Foyer, C.H., Mullineaux, P., pp. 1-42. Boca Raton, FL: CRC Press.

- Foyer, C.H., Lopez-Delgado, H., Dat, J.F., Scott, I.M. 1997. Hydrogen peroxide- and glutathione-associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signalling. *Physiol Plant.*, (100), 241-254.
- Foyer, C.H., Souriau, N., Perret, S., Lelandais, M., Kunert, K.J., 1995. Overexpression of glutathione reductase but not glutathione synthetase leads to increases in antioxidant capacity and resistance to photoinhibition in poplar trees. *Plant Physiol.* (109), 1047-57.
- Foyer, C.H., Vanacker, H., Gomez, L.D., Harbinson, J., 2002. Regulation of photosynthesis and antioxidant metabolism in maize leaves at optimal and chilling temperatures:review. *Plant Physiol. Biochem.*, (40), 659-668.
- Fridovich, I., 1995. Superoxide Radical and Superoxide Dismutases. *Annu. Rev. Biochem.*, (64), 97-112.
- Friedrich, T. and Bottcher, B., 2004. The gross structure of the respiratory Complex I: a Lego system. *Biochim. Biophys. Acta*, (1608), 1-9.
- Fryer, M.J., Oxborough, K., Martin, B., Ort, D.R., Baker, N.R., 1995. Factors associated with depression of photosynthetic quantum efficiency in maize at low growth temperature. *Plant Physiol.*, (108), 761-767.
- Gechev, T., Gadjev, I., Breusegem, F.V., Inze, D., Dukiandjiev, S., Taneve, V., Minkov, I., 2002. Hydrogen peroxide protect tobacco from oxidative stress by inducing a set of antioxidant enzymes. *CMLS*, (59), 708-714.
- Geisler, D.A., Johansson, F.I., Svensson, A.S., Rasmusson, A.G., 2004. Antimycin A treatment decreases respiratory internal rotenone-insensitive NADH oxidation capacity in potato leaves. *BMC Plant Biol.*, (12), 4-8.
- Gelhaye, E., Rouhier, N., Ge' rard J., Jolivet Y., Gualberto, J., Navrot N., Ohlsson, P., Wingsle, G., Hirasawa M., Knaff, D.B., Wang, H., Dizengremel, P., Meyer, Y., Jacquot, J., 2004a. A specific form of thioredoxin h occurs in plant mitochondria and regulates the alternative oxidase. *Plant Biology.*, 101 (40), 14545-14550.
- Genisel, M., Turk, H., Erdal, S., 2013. Exogenous progesterone application protects chickpea seedlings against chilling-induced oxidative stres. *Acta Physiol Plant.*, DOI 10.1007/ s11738-012-1070-3.
- Genişel, M., 2010. Kemik tozu solüsyonu, CaCl₂ ve IAA uygulamalarının tuz stresi altındaki Fasulye (*Phaseolus vulgaris*) bitkisinin fizyolojik parametreleri üzerine etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü., Erzurum.
- Gong, Y., Toivonen, P.M.A., Lau, O.L., Wiersma, P.A., 2001. Antioxidant system level in 'Braeburn' apple in related to its browning disorder. *Bot. Bull. Acad. Sin.*,(42), 259-264.
- Griffith, O.W., 1980. Determination of Glutathione and Glutathione Disulfide Using Glutathione Reductase and 2-Vinylpyridine. *Analyt. Biochem.*, (106), 207-212.
- Grill, E., Löffler, S., Winnacker, E.L., Zenk, M.H., 1989. Phytochelatin, the heavymetal binding peptides of plants, are synthesized from glutathione by a specific γ -glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase (phytochelatin synthase). *Proc. Natl. Acad. Sci.*, (86), 6838-42.
- Güler, N.S., 2008. *Ctenanthe setosa*'da yaprak kıvrılması sırasında apoplastik ve simplastik alanlarda antioksidan sistemde meydana gelen değişimler. Doktora Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.

- Haldimann, P., Fracheboud, Y., Stamp, P., 1996. Photosynthetic performance and resistance to photoinhibition of *Zea mays* L. Leaves grown at sub-optimal temperature. *Plant Cell Environ.*, (19), 85–92.
- Halliwell, B., 1984. Toxic Effects of Oxygen on Plant Tissues, In: *Chloroplast Metabolism, The Structure and Function of Chloroplasts in Green Leaf Cells*. Oxford Press, Oxford, 180-206.
- He, Y., Liu, Y., Cao, W., Huai, M., Xu, B., Huang, B., 2005. Effects of salicylic acid on heat tolerance associated with antioxidant metabolism in *Kentucky bluegrass*. *Crop Sci.*, (45), 988 – 995.
- Heath, R.L. and Packer, L., 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplast I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, (25), 189-198.
- Herschbach, C., Rennenberg, H., 1994. Influence of glutathione (GSH) on net uptake of sulphate and sulphate transport in tobacco plants. *J. Exp. Bot.*, (45), 1069-76.
- Hiser, C. and McIntosh, L., 1990. Alternative Oxidase of Potato Is an Integral Membrane Protein Synthesized *de Novo* during Aging of Tuber Slices. *Plant Physiology*, 93(1), 312-318.
- Hodges, D.M., Andrews, C.J., Johnson, D.A., Hamilton, R.I., 1996. Antioxidant compound responses to chilling stress in differentially sensitive inbred maize lines. *Physiol. Plant.*, 98, 685-692.
- Hodgson, R.A.J. and Raison, J.K., 1991. Superoxide production by thylakoids during chilling and its implication in the susceptibility of plants to chilling-induced photoinhibition. *Planta*, (183), 222-228.
- Hogewoning, S.W. and Harbinson, J., 2007. Insights on the development, kinetics, and variation of photoinhibition using chlorophyll fluorescence imaging of a chilled, variegated leaf. *J. Exp. Bot.*, (58), 453-463.
- Horemans, N., 1997. Ascorbate-mediated functions at the plasma membrane of higher plants. PhD thesis. Univ. Antwerpen, Belg.
- Hossain, M.A., Nakano, Y., Asada, K., 1984. Monodehydroascorbate reductase in spinach chloroplasts and its participation in regeneration of ascorbate for scavenging hydrogen peroxide. *Plant Cell Physiol.*, (25), 385-395.
[http://vpopov.professorjournal.ru/26\(15.12.2012\)](http://vpopov.professorjournal.ru/26(15.12.2012)).
- Hu, C. and Van Huystee, R.B., 1989. Immunochemical relatedness of two peanut peroxidase isozymes from peanut cell culture. *Biochem. Cell Biol.*, (37), 371-376.
- Hung, S.H., Yu, C.W., L, C.H., 2005. Hydrogen peroxide functions as a stress signal in plants. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 46, 1-10.
- Izabela, M.J. and Anna, M.R., 2003. Alternative oxidase in higher plants. *Acta Biochimica Polonica*, 50(4), 1257-1271.
- Jaleel, C.A., Sankar, B., Sridharan, R., Panneerselvam, R., 2007. Soil salinity alters growth, chlorophyll content, and secondary metabolite accumulation in *Catharanthus roseus*. *Turk. J. Biol.*, (32), 79–83.
- Javadian, N., Karimzadeh, G., Mahfoozi, S., Ghanati, F., 2010. Cold-induced changes of enzymes, proline, carbohydrates, and chlorophyll in wheat, *Russ. J. Plant Physiol.*, (57), 540-547.

- Jones, M.G., Bickar, D., Wilson, M.T., Brunori, M., Colosimo, A., Sarti, P., 1984. A re-examination of the reactions of cyanide with cytochrome c oxidase. *Biochem J.*, 220(1), 57-66.
- Juszczuk, I.M. and Anna M., 2003. Alternative oxidase in higher plants. *Acta Biochimica Polonica*, 50(4), 1257-1271.
- Kannerworff, W.A. and Van Der Plas, L.H.W., 1994. Respiration of bulb scale fragments of tulip after storage at 5°C. *Plant Sci.*, (104), 31-38.
- Kano, H. and Kumazawa, H., 1972. Studies on CN--insensitive respiration in plant roots III. Induction of CN--insensitive respiration with low concentrations of respiratory inhibitors. *Plant and Cell Physiology*, 13(2), 237-244.
- Kaur, G., Kumara, S., Thakura, P., Malika, J.A., Bhandharia, K., Sharmab,K.D., Nayyara,H., 2011. Involvement of proline in response of chickpea (*Cicer arietinum* L.) to chilling stress at reproductive stage. *Scientia Horticulturae*, (128), 174-181.
- Keha, E.E. ve Küfrevioğlu, Ö.İ., 2000. *Biyokimya.Safak Yayınları*, Erzurum, 107-115.
- Keles, Y., Oncel I., 2002. Response of antioxidative defence system to temperature and water stress combinations in wheat seedlings. *Plant Science*, (163), 783-790.
- Kingston-Smith, A.H., Harbinson, J., Williams, J., Foyer, C.H., 1997. Effect of chilling on carbon assimilation, enzyme activation, and photosynthetic electron transport in the absence of photoinhibition in maize leaves. *Plant Physiol.*, (114), 1039-1046.
- Kocsy, G., Szalai, G., Vagujfalvi, A., Stehli, L., Orosz, G., Galiba, G., 2000. Genetic study of glutathione accumulation during cold hardening in wheat. *Planta*, (210), 295-301.
- Kuk, Y.I., Sin, J.S., Burgos, N.R., Hwang, T.E., Han, O., Cho, B.H., Jung, S., Guh, J.O., 2003. Antioxidative enzymes offer protection from chilling damage in rice plants. *Crop Sci.*, (43), 2109-2117.
- Kumar, R.R., Goswami, S., Kumar, N., Pandey, S.K., Pandey, V.C., Sharma, S.K., Pathak, H., Rai, R.D., 2011. Expression of novel ascorbate peroxidase isoenzymes of wheat (*Triticum aestivum* L.) in response to heat stress. *International Journal of Plant Physiology and Biochemistry*, 3(11), 188-194.
- Kunert, K.J., Foyer, C., 1993. Thiol/ disulfide exchange in plants. In *Sulfur Nutrition and Sulfur Assimilation in Higher Plants*, ed. De Kok, L.J., Stulen, I., Rennenberg, H., Brunold, C., Rauser, W.E., pp. 139-51. The Hague: SPB Acad.
- Kuru, H.İ., 2007. Arseniğin insan ve bazı canlılarda oksidatif enzimler üzerine etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Dumlupınar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kütahya.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Heat of Bacteriophage T4. *Nature*, (227), 680-685.
- Laloi, C., Rayapuram, N., Chartier, Y., Grienberger, J.M., Bonnard, G., Meyer, Y., 2001. Identification and characterization of a mitochondrial thioredoxin system in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 14144-14149.
- Lambers, H., 1997. Oxidation of mitochondrial NADH and the synthesis of ATP. In Dennis, D.T., Turpin, D.H., Lefebvre, D.D., Layzell, D.B.eds, *Plant Metabolism*. Longman Singapore Publishers, Singapore, pp 200-219.
- Larcher, W., 2001. *Ökophysiologie der Pflanzen* (Stuttgart: Eugen Ulmer) p. 302.
- Laties, G.G., 1982. The cyanide-resistant, alternative path in higher plant respiration. *Annu Rev Plant Physiol.*, (33), 519-555.

- Law, M.Y., Charles, S.A., Halliwell, B., 1983. Glutathione and ascorbic acid in spinach (*Spinacea oleracea*) chloroplasts. *Biochem. J.*, (210), 899-903.
- Lee, B.R., Kim, K.Y., Jung, W.J., Avice, J.C., Ourry, A., Kim, T.H., 2007. Peroxidases and Lignification in Relation to the Intensity of Water-Deficit Stress in White Clover (*Trifolium repens* L.), *J. Exp. Bot.*, (13), 1-9.
- Lee, Y.B. and Lee, S.M., 2000. Effect of S-Adenosylmethionine on Hepatic Injury from Sequential Cold and Warm Ischemia. *Pharmacol. Res.*, (23), 495-500.
- Lemaire, S.D., Richardson, J.M., Goyer, A., Keryer, E., Lancelin, J.M., Makhatadze, G.I., Jacquot, J.P., 2000. Primary structure determinants of the pH and temperature-dependent aggregation of thioredoxin. *Biochim. Biophys. Acta*, (1476), 311-323.
- Lennon, A.M., Neuenschwander, U.H., Ribas-Carbo, M., Giles, L., Ryals, J.A., Siedow, J.N., 1997. The effect of salicylic acid and tobacco mosaic virus infection on the alternative oxidase of tobacco. *Plant Physiol.*, (115), 783-791.
- Levitt, J., 1980. Responses of plants to environment stress: chilling, freezing and high temperature stress, 2nd ed., Academic Press, New York.
- Li, J., Yan, X.F., Zu, Y.G., 2000. Generation of activated oxygen and change of cell defense enzyme activity in leaves of Korean pine seedling under low temperature. *Acta Botanica Sinica*, (2), 148-152.
- Li, J.T., Qiu, Z.B., Zhang, X.W., Wang, L.S., 2010. Exogenous hydrogen peroxide can enhance tolerance of wheat seedlings to salt stress. *Acta Physiologiae Plantarum*, (33), 835-842.
- Liu, E.H., 1973. A Simple Method for Determining the Relative Activities of Individual Peroxidase Isoenzymes in A Tissue Extract, *Anal. Biochem.*, (56), 149-154.
- Liu, Y., Jiang, H., Zhao, Z., An, L., 2011. Abscisic acid is involved in brassinosteroids-induced chilling tolerance in the suspension cultured cells from *Chorispora bungeana*. *Journal of Plant Physiology*, (168), 853-862.
- Lyons, J.M., 1973. Chilling injury in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, (24), 445-466.
- Mahajan, S. and Tuteja, N., 2005. Cold, salinity and drought stresses: an overview. *Arch. Biochem. Biophys.*, (444), 139-158.
- Mann, T. and Kleilin, D., 1938. Homocuprein and heptacuprein, copper-protein compounds of blood and liver in mammals. *Proc. R. Soc. London B.*, (126), 303-315.
- Matsuo, T.S.I. and Shitida, M., 1992. Correlation between Chilling Sensitivity of Plant Tissues and Fatty Acid Composition of Phosphatidylglycerols. *Phytochemistry*, (31), 2289.
- Maxwell, D.P., Wang, Y., McIntosh, L., 1999. The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, (96), 8271-6.
- McCain, T.N. and Hill, R.D., 1977. Cyanide-insensitive respiration in wheat: cultivar differences and effects of temperature, carbon dioxide, and oxygen. *Canadian Journal of Botany*, 55(5): 549-555.
- McCord, J.M. and Fridovich, I., 1969. Superoxide dismutase, an enzymatic function for erythrocyte. *J. Biol. Chem.*, (244), 6049-6055.
- McIntosh, L., 1994. Molecular biology of the alternative oxidase. *Plant Physiol.*, (105), 781-786.

- McIntosh, L., Eichler, G., Gray, G., Maxwell, D., Nickels, R., Wang, Y., 1998. Biochemical and genetic controls exerted by plant mitochondria. *Biochim Biophys Acta*, (1365), 278-84.
- McKersie, B.D., 1991. The role of oxygen free radicals in mediating freezing and desiccation stress in plants, in: Pell, E.J. and Steffen, K.L.(Eds.), *Active oxygen:oxidative stress and plant metabolism*. Am. Soc. Plant Physiol., 107-118.
- Meeuse, B.D.J., 1975. Thermogenic respiration in aroids. *Annu Rev Plant Physiol.*, (26), 117-26.
- Mehlhorn, H., Lelandais, M., Korth, H.G., Foyer, C.H., 1996. Ascorbate is the natural substrate for plant peroxidases. *FEBS Lett.*, (378), 203-6.
- Meister, A., 1983. Selective Modification of Glutathione Metabolism. *Science.*, (220), 472- 477.
- Meister, A., 1994. Glutathione-ascorbic acid antioxidant system in animals. *J. Biol. Chem.*,(269), 9397-400.
- Michae, O.D., 1989. Characterization of the alternative respiratory pathway in soybean Ph. D. Theses. Iowa State University.ABD.
- Michel, H., Behr, J., Harrenga, A., Kannt, A., 1998. Cytochrome c oxidase: structure and spectroscopy. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, (27), 329-356.
- Millar, A.H., Wiskich, J.T., Whelan, J., Dat, A.D., 1993. Organic acid activation of the alternative oxidase of plant mitochondria. *FEBS Lett.*, (329), 259-262.
- Minagawa, N. and Yoshimoto, A., 1987. The induction of cyanide-insensitive respiration in *Hansenula anomala*. *J. Biochem.*, (101), 1141-1146.
- Minagawa, N., Sakajo, S., Komiyama, T., Yoshimoto, A., 1990. A 36-kDa mitochondrial protein is responsible for cyanide-resistant respiration in *Hansenula anomala*. *FEBS. Lett.*, 264(1), 149-152.
- Minibaeva, F.V. and Gordon, L.K., 2003. Superoxide production and the activity of extracellular peroxidase in plant tissues under stress conditions. *Russ. J. of Plant Physiology*, 50(3), 411-416.
- Miyake, C. And Asada, K., 1992. Tylakoid Bound Ascorbate Peroxidase in Spinach Chloroplasts and Photoreduction of Its Primary Oxidation Product Monodehydroascorbate Radicals in the Tylakoids. *Plant Cell Physiol.*, (33), 541-553.
- Moller, I.M. and Kristensen, B.K., 2004. Protein oxidation in plant mitochondria as a stress indicator. *Photochem. Photobiol. Sci.*, (3), 730-735.
- Moller, I.M., 2002. A new dawn for plant mitochondrial NAD(P)H Dehydrogenases. *Trends in Plant Science*, 7(6), 232-240.
- Moore, A.L., Siedow, J.N. 1991. The regulation and nature of the cyanide-resistant alternative oxidase of plant mitochondria. *Biochim Biophys Acta*, (1059), 121-140.
- Mutlu, S., 2009. Salisilik asidin arpada (*Hordeum vulgare* L.) soğuk toleransını sağlama ve apoplastik ile simplastik proteinler üzerine etkilerinin incelenmesi. Doktora Tezi. Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Nakano, Y. and Asada, Y., 1981. Hydrogen Peroxide is Scavenged by Ascorbate-Specific Peroxidase in Spinach Chloroplasts, *Plant Cell Physiol.*, (22), 867-880.
- Nakano, Y., Asada, K., 1987. Purification of ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts: its inactivation in ascorbate-depleted medium and reactivation by monodehydroascorbate radical. *Plant Cell Physiol.*, (28),131-40.

- Navrot, N., Rouhier, N., Gelhaye, E., Jacquot, J.P., 2007. Reactive oxygen species generation and antioxidant systems in plant mitochondria. *Physiol. Plant.*, (129), 185-195.
- Nayyar, H., Bains, T.S., Kumar, S., 2005. Chilling stressed chickpea: effect of cold acclimation, calcium and abscisic acid on cryoprotective solutes and oxidative damage. *Environ. Exp. Bot.*, (54), 275-285.
- Nijs, D., Kelley, P.M., 1991. Vitamins C and E donate single hydrogen atoms *in vivo*. *FEBS Lett.*, (284), 147-51.
- Nishiyama, Y., Ikeda, H., Haramaki, N., 1998. Oxidative Stress is Related to Exercise in Tolerance in Patients With Heart Failure. *Am. Heart. J.*, (135), 115.
- Nobuyuki, M., Atsushi, S., Fuminori, K., Shigeo, T., 2008. Mitochondrial alternative pathway is associated with development of freezing tolerance in common wheat. *Journal of Plant Physiology*, (165), 462-467.
- Noctor, G., and Foyer, C.H., 1998. Ascorbate and Glutathione, Keeping Active Oxygen Under Control, *Ann. Review of Plant Physiol. Plant Mol. Biology*, (49), 249-279.
- Okuda, T., Matsuda, Y., Yamanaka, A., Sagisaka, S., 1991. Abrupt increase in the level of hydrogen peroxide in leaves of winter wheat is caused by cold treatment. *Plant Physiol.*, (97), 1265-1267.
- Ortiz-Lopez, A., Nie, G.Y., Ort, D.R., Baker, N.R., 1990. The involvement of the photoinhibition of photosystem II and impaired membrane energization in the reduced quantum yield of carbon assimilation in chilled maize. *Planta*, (181), 78-84.
- Padh, H., 1990. Cellular functions of ascorbic acid. *Biochem. Cell Biol.*, (68), 1166-73.
- Parsons, H.L., 1998. The role of alternative pathway respiration in plant cells growing under phosphorus limitation: A study using transgenic *Nicotiana Tabacum* cells lacking the alternative oxidase. Master Thesis. University of Toronto.
- Pastore, D., Trono, D., Laus, M.N., Di Fonzo, N., Passarella, S., 2001. Alternative oxidase in durum wheat mitochondria. Activation by pyruvate, hydroxypyruvate and glyoxylate and physiological role. *Plant Cell Physiol.*, 42, 1373-1382.
- Patykowski, J. and Urbanek H., 2003. Activity of enzymes related to H₂O₂ generation and metabolism in leaf apoplastic fraction of tomato leaves infected with *Botrytis cinerea*. *Journal of Phytopathology*, (151), 153-161.
- Pearce, R.S., 1999. Molecular analysis of acclimation to cold. *Plant Growth Regul.*, (29), 47-76.
- Pitcher, L.H., Brennan, E., Hurley, A., Dunsmuir, P., Tepperman, J.M., Zilinskas, B.A. 1991. Overproduction of petunia chloroplastic copper / zinc superoxide dismutase does not confer ozone tolerance in transgenic tobacco. *Plant Physiol.*, (97), 452-455.
- Plummer, D.T., 1980. Assay methods. in: Plummer (Ed.), D.T., *An Introduction to Practical Biochemistry*. British Library, London, pp. 119-159.
- Polle, A., Chakrabarti, K., Schiirmann, W., Rennenberg, H., 1990. Composition and properties of hydrogen peroxide decomposing systems in extracellular and total extracts from needles of Norway spruce (*Picea abies* L., Karst.). *Plant Physiol.*, (94), 312-319.
- Popov, V.N., Simonian, R.A., Skulachev, V.P., Starkov, A.A., 1997. Inhibition of the alternative oxidase stimulates H₂O₂ production in plant mitochondria. *FEBS Letters*, (415), 87-90.

- Prasad, T.K., Anderson, M.D., Martin, B.A., Stewart, C.R., 1994. Evidence for chilling-induced oxidative stress in Maize seedlings and a regulatory role for hydrogen peroxide. *Plant Cell.*, (6), 65-74.
- Purvis, A.C. and Shewfelt, R.L., 1993. Does the alternative pathway ameliorate chilling injury in sensitive plant tissues? *Physiol Plant.*, (88), 712-718.
- Purvis, A.C., 1997. Role of the alternative oxidase in limiting superoxide production by plant mitochondria. *Physiologia Plantarum*, 100(1), 165-170.
- Ranieri, A., Castagna, A., Scebba, F., Careri, M., Zagnoni, I., Predieri, G., Pagliari, M., Sanita`di Toppi, L., 2005. Oxidative stress and phytochelatin characterisation in bread wheat exposed to cadmium excess. *Plant Physiol. Biochem.*, (43), 45-54.
- Ranieri, A., D'Urso, G., Nali, C., Lorenzini, G., Soldatini, G.F., 1996. Ozone stimulates apoplasmic antioxidant systems in pumpkin leaves. *Physiol. Plant.*, (97), 381-87.
- Rausser, W.E., 1987. Changes in glutathione content of maize seedlings exposed to cadmium. *Plant Sci.*, (51), 171-75.
- Rennenberg, H., and Lamourex, G.L., 1990. Physiological Processes That Modulate The Concentration of Glutathione in Plant Cells. In: *Sulfur Nutrition and Assimilation in Higher Plants, Fundamental Environmental and Agricultural Aspects*, Rennenberg, H., Brunold, C., De Kok, L.J., Stulen, I., Ed., SPB Academic Publication., The Hague, 53-65.
- Ribas-Carbo, M., Aroca, R., Gonzalez-Meler, M.A., Irigoyen, J.J., Sanchez-Diaz, M., 2000. The electron partitioning between the cytochrome and the alternative respiratory pathways during chilling recovery in two cultivars of maize differing in chilling sensitivity. *Plant Physiol.*, (122), 199-204.
- Rice-Evans, C.A., Diplock, A.T., Symons, M.C.R., 1991. Mechanisms of radical production, in: *Burdon, R.H. and Van Knippenberg P.H.(Eds.), Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology. Vol. 22, Techniques in Free Radical Research. Elsevier, Amsterdam, pp. 19-50.*
- Rinco'n, F., Marti'nez, B., Ibanez, M.V., 1998. Proximate composition and antinutritive substances in chickpea (*Cicer arietinum* L.) as affected by the biotype factor. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 78, 382-388.
- Risse, L.A., Chun, D., Miller, W.R., 1987. Chilling injury and decay of film-wrapped and conditioned bell peppers during cold storage. *Trop. Sci.*, (27), 85-90.
- Roberts, H., Smith, S.C., Marzuki, S., Linnane, A.W., 1980. Evidence that cytochrome b is the antimycin-binding component of the yeast mitochondrial cytochrome bc₁ complex. *Arch Biochem Biophys.*, (200), 387-395.
- Rout, G.R., Samantaray, S., Das, P., 2000. *In vitro* rooting of *Psoralea corylifolia* Linn: Peroxidase activity as a marker, *Plant Growth Regul.*, (305), 215-219.
- Rymen, B., Fiorani, F., Kartal, F., Vandepoele, K., Inz, D., Beemster, G.T.S., 2007. Cold nights impair leaf growth and cell cycle progression in maize through transcriptional changes of cell cycle genes. *Plant Physiol.*, 143(3), 1429.
- Sairam, R.K. and Srivastava, G.C., 2000. Induction of oxidative stress and antioxidant activity by hydrogen peroxide treatment in tolerant and susceptible wheat genotypes. *Biologia Plantarum*, 43(3), 381-386.
- Saltveit, M.E. and Morris, L.L., 1990. Overview of chilling injury in horticultural crops, *Chilling Injury of Horticultural Crops*, C.Y. Wang (eds), CRC Press, Boca Raton, FL., pp. 3-15.

- Sanchez-Fernandez, R., Fricker, M., Corben, L.B., White, N.S., Sheard, N., 1997. Cell proliferation and hair tip growth in the *Arabidopsis* root are under mechanistically different forms of redox control. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, (94), 2745-50.
- Saruyama, H. and Tanida, M., 1995. Effect of chilling on activated oxygen-scavenging enzymes in low temperature-sensitive and -tolerant cultivars of rice (*Oryza sativa* L). *Plant Science*, (109), 105-113.
- Scandalios, J.G., 1990. Response of plant antioxidant defense genes to environmental stress, in: J.G. Scandalios and T.R.F. Wright (Eds.), *Advances in Genetics*. Vol. 28, *Genomic Responses to Environmental Stress*. Academic Press, San Diego, pp, 1-41.
- Scandalios, J.G., 1993. Oxygen Stress and Superoxide Dismutase. *Plant Physiol.*, (101), 7-12.
- Scebba, F., Sebastiani, L., Vitagliano, C., 1999. Protective enzymes against activated oxygen species in wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings: Responses to cold acclimation. *J. Plant Physiol.*, 155, 762-768.
- Scheller, H.V., Huang, B., Hatch, E., Goldsbrough, P.B., 1987. Phytochelatin synthesis and glutathione levels in response to heavy metals in tomato cells. *Plant Physiol.*, (85), 1031-35.
- Schonbaum, G.S., Bonnet, W.D.J., Storey, B.T., Bahr, J.T., 1971. Specific inhibition of the cyanide-insensitive respiratory pathway in plant mitochondria by hydroxamic acids. *Plant Physiol.*, (47), 124-128.
- Schürmann, P. and Jacquot, J.P., 2000. Plant Thioredoxin Systems Revisited. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, (51), 371-400.
- Searle, S.Y., Thomas, S., Griffin, K.L., Horton, T., Kornfeld, A., Yakir, D., Hurry, V., Turnbull, M.H., 2010. Leaf respiration and alternative oxidase in field-grown alpine grasses respond to natural changes in temperature and light. *New Phytol.*, (189), 1027-1039.
- Shao, H.B., Chu, L.Y., Shao, M.A., Jaleel, C.A., Mi, H.M., 2008. Higher plant antioxidants and redox signaling under environmental stresses. *CR Biol.*, (331), 433-441.
- Shaul, O., Mironov, V., Burssens, S., Van Montagu, M., Inze, D., 1996. Two *Arabidopsis* cyclin promoters mediate distinctive transcriptional oscillation on synchronised tobacco 3Y-2 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, (93), 4868-72.
- Shen, W.Y., Nada, K., Tachibana, S., 1999. Oxygen radical generation in chilled leaves of cucumber (*Cucumis sativus* L.) cultivars with different tolerances to chilling temperature. *J. Jap. Soc. Hort. Sci.*, (68), 780-787.
- Siedow J.N. and Moore, A.L., 1993. A kinetic model for the regulation of electron transfer through the cyanide-resistant pathway in plant mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta*, (1142), 165-174.
- Siedow, J.N., Umbach, A.L., Moore, A.L., 1995. The active site of the cyanide-resistant oxidase from plant mitochondria contains a coupled binuclear iron center. *FEBS Lett.*, (362), 10-14.
- Simons, B.H. and Lambers, H., 1999. The alternative oxidase: is it a respiratory pathway allowing a plant to cope with stress? In: Lerner HR (ed) *Plant Responses to Environmental Stress: From Phytohormones to Gene Reorganization*. Marcel Dekker Inc, New York, pp, 265-286.

- Simons, B.H., Millenaar, F.F., Mulder, L., Van Loon, L.C., Lambers, H., 1999. Enhanced expression and activation of the alternative oxidase during infection of Arabidopsis with *Pseudomonas syringae* pv tomato. *Plant Physiol.*, (120), 529-38.
- Slesak, I., Libik, M., Karpinska, B., Karpinski, S., Miszalski, Z., 2007. The Role of Hydrogen Peroxide in Regulation of Plant Metabolism and Cellular Signalling in Response to Environmental Stresses. *Acta Biochim. Pol.*, (54), 39-50.
- Spiteller, G., 2001. Peroxidation of lineoleic acid and its relation to aging and age dependent diseases. *Mechanisms of Ageing and Development*, (122), 617-657.
- Sramkova, Z., Gregovab, E., Sturdika, E., 2009. Chemical composition and nutritional quality of wheat grain. *Acta Chimica Slovaca*, 2(1), 115-138.
- Srinivasan, A., Johansen, C., Saxena, N.P., 1998. Cold tolerance during early reproductive growth of chickpea (*Cicer arietinum* L.): characterization of stress and genetic variation in pod set. *Field Crops Research*, (57), 171-191.
- Stahl, W. and Sies, H., 2002. Introduction: Reactive Oxygen Species, *Research Monographs*, 1-2.
- Steponkus, P. L., 1992. Preface, *Advances in Low Temperature Biology*, (1), 9-11.
- Stock, D., Gibbons, C., Arechaga, I., Leslie, A.G., Walker, J.E., 2000. The Rotary mechanism of ATP synthase. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, (10), 672-679.
- Storey, B.T., 1972. The respiratory chain of plant mitochondria XIII. Redox state changes of cytochrome b562 in mung bean seedling mitochondria treated with antimycin A. *Biochim Biophys Acta*, (267), 48-64.
- Streb, P., Aubert, S., Gout, E., Bigny, R., 2003. Cold- and lightinduced changes of metabolite and antioxidant levels in two high mountain plant species *Soldanella alpina* and *Ranunculus glacialis* and a lowland species *Pisum sativum*. *Physiologia Plantarum*, 118, 96-104.
- Streb, P., Michael-Knauf, A., Feierabend, J., 1993. Preferential Photoinactivation of Catalase and Photoinhibition of Photosystem II are Common Early Symptoms under Various Osmotic and Chemical Stress Conditions. *Physiol. Plant.*, (88), 590-598.
- Streb, P., Shang, W., Feierabend, J., 1999. Resistance of cold-hardened winter rye leaves (*Secale cereale* L.) to photo-oxidative stress. *Plant Cell Environ.*, (22), 1211-1223.
- Suzuki, N., Mittler, R., 2006. Reactive oxygen species and temperature stresses: A delicate balance between signaling and destruction, *Physiol. Plant.*, (126), 45-51.
- Taiz, L. and Zeiger, E., Çeviri; Türkan, I., 2008. *Bitki fizyolojisi*. 236 s., İzmir.
- Tambussi, E.A., Bartoli, C.G., Guiamet, J.J., Beltrano, J., Araus, J.L., 2004. Oxidative stress and photodamage at low temperatures in soybean (*Glycine max* L. Merr.) leaves. *Plant Sci.*, (167), 19-26.
- Taşgım, E., 2004. Düşük sıcaklık ve salisilik asidin kışık buğday yapraklarındaki donma toleransı, oksidatif enzim aktiviteleri ve apoplastik proteinler üzerine etkileri. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Topal, A., 1993. Konya ekolojik şartlarında bazı arpa çeşitlerinde (*Hordeum vulgare* L.) farklı ekim zamanlarında kışa dayanıklılık, dane verimi, verim unsurları ve kalite özelliklerine etkileri üzerine bir araştırma. Doktora Tezi. Selçuk üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya.

- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J., 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci.*, 76(9), 4350-4354.
- Turan, O. and Ekmekci, Y., 2011. Activities of photosystem II and antioxidant enzymes in chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars exposed to chilling temperatures. *Acta Physiol. Plant.*, (33), 67-78.
- Umbach, A.L., Lacey, E.P., Richter, S.J., 2009. Temperature-sensitive alternative oxidase protein content and its relationship to floral reflectance in natural *Plantago lanceolata* populations. *New Phytol.*, (181), 662-671.
- Umbach, A.L., Siedow, J.N., 1993. Covalent and noncovalent dimers of the cyanide-resistant alternative oxidase protein in higher plant mitochondria and their relationship to enzyme activity. *Plant Physiol.*, (103), 845-54.
- Van Camp, W., Van Montagu, M., Inze, D., 1994. Superoxide dismutases. In: Foyer, C.H. and Mullineaux, P.M.(eds), *Causes of photooxidative stress and amelioration of defense systems in plants*. CRC Press Inc. Boca Raton., 317-341.
- Van Heerden, P.D.,R. and Krüger G.H.J., 2002. Separately and simultaneously induced dark chilling and drought stress effects on photosynthesis, proline accumulation and antioxidant metabolism in soybean. *J. Plant Physiol.*, (159), 1077-1086.
- Van Heerden, P.D.R. and Krüger, G.H.J., 2000. Photosynthetic limitation in soybean during cold stress. *S. Afr. J. Sci.*, (96), 201-206.
- Vanacker, H., Carver, T.L.W., Foyer, C.H., 1998. Pathogen-Induced Changes in the Antioxidant Status of the Apoplast in Barley Leaves. *Plant Physiol.*, (117), 1103-1114.
- Vanlerberghe, G.C. and McIntosh, L., 1996. Signals regulating the expression of the nuclear gene encoding alternative oxidase of plant mitochondria. *Plant Physiol.*, (111), 589-595.
- Vanlerberghe, G.C. and McIntosh, L., 1997. Alternative oxidase: from gene to function. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.*, (48), 703-34.
- Vanlerberghe, G.C., Cvetkovska, M., Wang, J., 2009. Is the maintenance of homeostatic mitochondrial signaling during stress a physiological role for alternative oxidase? *Physiol Plant.*, 137(4), 392-406.
- Vanlerberghe, G.C., Day, D.A., Wiskich, J.T., Vanlerberghe, A.E., McIntosh, L., 1995. Alternative Oxidase Activity in Tobacco Leaf Mitochondria (Dependence on Tricarboxylic Acid Cycle-Mediated Redox Regulation and Pyruvate Activation). *Plant Physiol.* 1995 October; 109(2): 353–361.
- Vanlerberghe, G.C., McIntosh, L., 1992a. Lower growth temperature increases alternative pathway capacity and alternative oxidase protein in tobacco. *Plant Physiol.*, (100), 115-119.
- Vanlerberghe, G.C., McIntosh, L., 1992b. Coordinate Regulation of Cytochrome and Alternative Pathway Respiration in Tobacco. *Plant Physiol.*, (100), 1846-1851.
- Vanlerberghe, G.C., Yip, J.Y.H., Parsons, H.L., 1999. In organello and in vivo evidence of the importance of the regulatory sulfhydryl/disulfide system and pyruvate for alternative oxidase activity in tobacco. *Plant Physiol.*, (121), 793-803.
- Vernieri, P., Lenzi, A., Figaro, M., Tognoni, F., Pardossi, A., 2001. How the roots contribute to the ability of *Phaseolus vulgaris* L. to cope with chilling induced water stress, *J. Exp. Bot.*, (52), 2199-2206.

- Wagner, A.M., Moore, A.L. 1997. Structure and function of the plant alternative oxidase: its putative role in the oxygen defence mechanism. *Biosci Rep.*, (17), 319-333.
- Walker, M.A, McKersie, B.D., 1993. Role of ascorbateglutathione antioxidant system in chilling resistance of tomato. *J Plant Physiol.*, (141), 234-239.
- Wang, J., Rajakulendrana, N., Amirsadeghia, S., Vanlerberghea, G.C., 2011. Impact of mitochondrial alternative oxidase expression on the response of *Nicotiana tabacum* to cold temperature. *Physiologia Plantarum*, (142), 339-351.
- Wang, L.J., Huang,W.D., Li, J.Y., 2003a. Effects of salicylic acid on the peroxidation of membrane-lipid of leaves in grape seedlings. *Scientia Agricultura Sinica.*, 36(9), 1076-1080.
- Wang, W., Vinocur, B., and Altman, A., 2003b. Plant Responses to Drought, Salinity and Extreme Temperature: Towards Genetic Engineering for Stress Tolerance. *Planta*, (218), 1–14.
- Whetten, R.W., MacKay, J.J., Sederoff, R.R., 1998. Recent advances in understanding lignin biosynthesis. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.*, (49), 585-609.
- Willits, D.H. and Peet, M.M., 1998. The effect of night temperature on greenhouse grown tomato yields in warm climates. *Agric. Forest Meteorol.*, (92), 191-202.
- Wilson, D.F., 1967. Azide inhibition of mitochondrial electron transport II. Spectral changes induced by azide. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 131(3), 431-440.
- Wingate, V.P.M., Lawton, M.A., Lamb, C.J., 1988. Glutathione causes a massive and selective induction of plant defense genes. *Plant Physiol.*,(31), 205-211.
- Wise, R.R. and Naylor, A.W., 1987. Chilling-enhanced photooxidation. Evidence for the role of singlet oxygen and superoxide in the breakdown of pigments and endogenous antioxidants. *Plant Physiol.*, (83), 278-282.
- Wise, R.R., 1995. Chilling-enhanced photooxidation: the production, action and study of reactive oxygen species produced during chilling in the light. *Photosynth. Res.*, (45), 79-97.
- Wu T., Hsu, Y., Lee, T., 2009. Effects of cadmium on the regulation of antioxidant enzyme activity, gene expression, and antioxidant defenses in the marine macroalga *Ulva fasciata*. *Botanical Studies*, 50, 25-34.
- Yamaguchi, K., Mori, H., Nishimura, M., 1995. A novel isozyme of ascorbate peroxidase localized on glyoxysomal and leaf peroxisomal membranes in pumpkin. *Plant Cell Physiol.* (36), 1157–62.
- Yankovskaya, V., Horsefield, R., Törnroth, S., Luna-Chavez, C., Miyoshi, H., Léger, C., Byrne, B., Cecchini, G., Iwata, S., 2003. Architecture of succinate dehydrogenase and reactive oxygen species generation. *Science*, (299), 700-704.
- Yannarelli, G.G., Ferná'ndez-Alvarez, A.J., Santa-Cruz, D.M., Tomaro, M.L., 2007. Glutathione reductase activity and isoforms in leaves and roots of wheat plants subjected to cadmium stres. *Phytochemistry*, (68), 505-512.
- Yee, Y., Tam, N.F.Y., Wong, Y.S., Lu, C.Y., 2002. Growth and physiological responses of two mangrove species (*Bruguira gymnorhiza* and *Kandelia candel*) to waterlogging. *Environ. Exp. Bot.*, 1-13.
- Yılmaz, S. ve Ozan, T.S., 2003. Meme kanserli hastalarda lipid peroksidasyonu ve bazı enzim aktiviteleri arasındaki ilişkisi. *Türk Biyokimya Dergisi*, 28(4), 252-256.

- Yordanova, R.Y., Christov, K.N., Popova L.P., 2004. Antioxidative enzymes in barley plants subjected to soil flooding. *Environ. and Exp. Botany*, (51), 93-101.
- Zhang ,Y., Tang, H., Luo, Y., 2008. Variation in Antioxidant Enzyme Activities of Two Strawberry Cultivars with Short-term Low Temperature Stress . *World Journal of Agricultural Sciences* , (4): 458-462.
- Zhang, G.X., 2004. Effect of low-temperature stress activity in leaves of maize seeding under the stres on physiological reaction of cineraria. *Journal of of low temperature. Bulletin of Botanical Research*, 5: 89-92.
- Zhang, W.P., Jiang, B., Lou, L.N., Lu, M.H., Yang, M., Chen, J.F., 2011. Impact of Salicylic acid on the antioxidant enzyme system and hydrogen peroxide production in *Cucumis sativus* under chilling stress. *Z. Naturfosch C.*, 66, 413-422.
- Zhou, D. and Solomos, T., 1998. Effect of hyPODia on sugar accumulation, respiration, activities of amylase and starch phosphorylase, and induction of alternative oxidase and acid invertase during storage of potato tubers (*Solanum tuberosum* cv. Russet Burbank) at 1°C. *Physiologia Plantarum*, 104(2), 255-265.

ÖZGEÇMİŞ

1978 yılında Erzurum'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Erzurum'da tamamladı. 1996 yılında girdiği Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden 2000 yılında mezun oldu. Aynı yıl Milli Eğitim Bakanlığı kadrosu ile öğretmenliğe atandı. Çeşitli okullarda öğretmenlik ve idarecilik yaptı. 2007 yılında başladığı Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında lisans üstü öğrenimine devam etmektedir. 2009 yılında araştırma görevlisi olarak atandığı Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi'nde halen araştırma görevlisi olarak çalışmaktadır. Evli ve iki çocuk babasıdır.